

**Analysen zur Identifizierung
von Interaktionspartnern
der Molybdän-Insertase Cnx1
aus *Arabidopsis thaliana***

**Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**



**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**genehmigte
D i s s e r t a t i o n**

**von Jan Winking
aus Lübeck**

1. Referent:	Prof. Dr. R. R. Mendel
2. Referent:	Prof. Dr. G. Schwarz
eingereicht am:	23. 8. 2005
mündliche Prüfung am:	6. 3. 2006

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Winking, J., Mendel, R.R., & Schwarz, G: Identification of novel ligands of plant Cnx1, the enzyme catalyzing the metal transfer to the molybdenum cofactor. EU FPV Research Training Network on Vitamins and Cofactors (Viteomics), Cambridge (2005)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Die biologische Bedeutung des Spurenelements Molybdän	1
1.2	Die Entdeckung des Molybdäncofaktors	2
1.3	Die Struktur des Molybdäncofaktors	3
1.4	Die Synthese des Molybdäncofaktors	4
1.4.1	Der erste Schritt der Moco-Biosynthese - Bildung von Precursor Z	4
1.4.2	Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese - Konversion zu MPT	6
1.4.3	Der dritte Schritt der Moco-Biosynthese - Insertion des Molybdäns	7
1.4.4	Der vierte Schritt der Moco-Biosynthese - Modifikationen des Molybdäncofaktors	8
1.5	Ziele der Arbeit	11

2. Ergebnisse

2.1	Gezielte Untersuchung potentieller Interaktionspartner des Cnx1-Proteins	14
2.1.1	Erzeugung von Cnx1-Expressionskonstrukten	14
2.1.1.1	Erzeugung von Cnx1-Konstrukten zur rekombinanten Expression in <i>E. coli</i>	14
2.1.1.2	Erzeugung von Cnx1-Konstrukten zur <i>in vitro</i> -Transkription/Translation	15
2.1.1.3	Erzeugung von Cnx1-Konstrukten für GAL4 <i>Two Hybrid Assays</i>	15
2.1.2	Aufreinigung von rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten aus <i>E. coli</i>	16
2.1.3	Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: <i>A. thaliana</i> Profiline	17
2.1.3.1	Klonierung von PRF1 und PRF2 zur rekombinanten Expression in <i>E. coli</i>	17
2.1.3.2	Klonierung von PRF1 und PRF2 für GAL4 <i>Two Hybrid Assays</i> und <i>in vitro</i> -Transkription/Translation	18
2.1.3.3	Expression und Aufreinigung von PFR1 und PRF2	19
2.1.3.4	Cnx1-Interaktionsstudien mit PFR1 und PRF2	20

2.1.4	Potentielle Interaktionspartner von Cnx1:	
	<i>A. thaliana</i> APG8-Proteine	22
2.1.4.1	Klonierung von APG8h und APG8i zur rekombinanten Expression in <i>E. coli</i>	23
2.1.4.2	Klonierung von APG8-Proteinen für GAL4 <i>Two Hybrid Assays</i> und Transkription/Translation <i>in vitro</i>	24
2.1.4.3	Expression und Aufreinigung von APG8h und APG8i	25
2.1.4.4	Cnx1-Interaktionsstudien mit APG8-Proteinen	26
2.1.5	Potentielle Interaktionspartner von Cnx1:	
	<i>A. thaliana</i> Cnx6 und Cnx7	30
2.1.6	Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: <i>A. thaliana</i> L12	31
2.2	Suche nach Interaktionspartnern des Cnx1-Proteins mittels USPS <i>Two Hybrid Screens</i>	33
2.2.1	Etablierung des Cnx1- <i>Bait</i> -Konstruktes	34
2.2.2	<i>Library Screen</i> ohne Induktion der <i>Prey</i> -Expression	36
2.2.3	<i>Library Screen</i> mit Induktion der <i>Prey</i> -Expression	38
2.2.4	Experimentelle Analysen zur Verifizierung potentieller Cnx1-Interaktionspartner	43
2.2.4.1	<i>In vivo</i> -Co-Lokalisierungsexperimente von GFP-Cnx1 mit DsRed-Fusionen potentieller Liganden	44
2.2.4.2	<i>In vivo</i> -Co-Lokalisierungsexperimente von DsRed-Cnx1 mit GFP-Fusionen potentieller Liganden	46
2.2.4.3	Klonierung, Expression und Aufreinigung von <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden	49
2.2.4.4	<i>Pull Down</i> -Experimente mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten	51
2.2.4.5	<i>Pull Down</i> -Experimente mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und <i>A. thaliana</i> Proteinrohextrakt	52
2.2.4.6	<i>Pull Down</i> -Experimente mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und <i>in vitro</i> -translatiertem Cnx1	53
2.2.4.7	<i>Pull Down</i> -Experimente mit Cnx1- <i>Intein</i> und <i>in vitro</i> -translatierten potentiellen Liganden	54
2.2.4.8	ELISA-basierte Interaktionsstudien mit Cnx1 und potentiellen Liganden	56

3.	Diskussion	
3.1	Gezielte Cnx1-Interaktionstests	58
3.1.1	Profiline als potentielle Cnx1-Interaktionspartner	58
3.1.2	Untersuchung GABARAP-homologer Proteine auf Interaktion mit Cnx1	60
3.1.3	Weitere gezielte Interaktionstests mit Cnx1	63
3.2	USPS <i>Two Hybrid Screens</i> nach Cnx1-Interaktionspartnern	64
3.2.1	Durchführung der USPS <i>Two Hybrid Screens</i>	65
3.2.2	Auswertung der USPS-Ergebnisse	66
3.2.2.1	Das putative Kupfer-Chaperon (CCH) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1	68
3.2.2.2	Das putative Nickel-/Nukleotid-bindende Urease Hilfs-Protein (UreG) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1	71
3.2.2.3	Thioredoxine (TRX-H-2/TRX-H-3) als mögliche Interaktionspartner von Cnx1	73
3.2.2.4	Die putative Nukleotid-Hydrolase (HIT) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1	74
3.2.2.5	Die Adenin Phosphoribosyltransferase 1 (APRT1) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1	76
3.3	Ausblick	77
4.	Material und Methoden	
4.1	Laborstandards	79
4.1.1	Verwendete Materialien und Chemikalien	79
4.1.2	Verwendete Organismen-Stämme	79
4.1.3	Verwendete Plasmide	80
4.2	Molekularbiologische Standardmethoden	80
4.2.1	Klonierungstechniken	80
4.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	81
4.2.2.1	PCR-Mutagenese	82
4.2.2.2	Fusions-PCR	82
4.2.2.3	<i>Yeast Colony</i> PCR	83
4.2.3	DNA-Sequenzierung	83
4.3	Proteinbiochemische Standardmethoden	83
4.3.1	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	83
4.3.1.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung von <i>His-Tag</i> Proteinen	84

4.3.1.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen mittels <i>Intein-Tag</i>	85
4.3.2	<i>in vitro</i> -Transkription/Translation von Proteinen	85
4.3.3	Präparation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protein-Rohextrakt	86
4.3.4	Chromatographische Auftrennung von Proteinen an der FPLC	86
4.3.4.1	Gelfiltration	87
4.3.4.2	Anionenaustausch-Chromatographie	87
4.3.5	Umpuffern von Proteinlösungen	87
4.3.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	88
4.3.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	88
4.3.8	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	88
4.3.9	Immunblot-Analyse (Western-Blot)	89
4.3.10	<i>Enzyme Linked Immunosorbend Assay</i> (ELISA)	90
4.3.11	<i>Dot Overlay Assay</i>	90
4.3.12	<i>Pull Down Assay</i>	91
4.4	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
4.4.1	<i>Yeast Two Hybrid Assays</i>	91
4.4.1.1	<i>GAL4 Two Hybrid Assay</i>	92
4.4.1.2	<i>USPS Two Hybrid Assay</i>	93
4.4.2	Lagerung und Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	93
4.4.3	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	94
4.4.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	94
4.4.4.1	<i>USPS Library Transformation</i>	94
4.4.5	<i>5-FOA Assay</i>	95
4.4.6	β -Galaktosidase <i>Assay</i>	96
4.4.7	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	96
4.4.7.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	97
4.4.7.2	Elektroporation	97
4.4.8	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> mittels NucleoSpin Plasmid Kit	98
4.5	Arbeiten mit humanen Zelllinien	99
4.5.1	Transiente Transfektion von HeLa- und HEK293-Zellen	100
4.5.2	Vorbereitung der transfizierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	100
4.5.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	101
5.	Zusammenfassung	102
6.	Literaturverzeichnis	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die vier Schritte der Molybdäncofaktor-Biosynthese	10
Abb. 1.2	Modell der Gephyrin-Lokalisierung in neuronalen Zellen	12
Abb. 1.3	Modell der Lokalisierung von Cnx1 in pflanzlichen Zellen	13
Abb. 2.1	Übersicht der erzeugten Cnx1-Varianten	15
Abb. 2.2	Aufreinigung von Cnx1- <i>Intein</i>	17
Abb. 2.3	Sequenzalignment der Profiline 1-4 aus <i>A. thaliana</i> mit humanem Profilin 1	18
Abb. 2.4	Aufreinigung von PRF1 und PRF2 <i>His-Tag</i>	19
Abb. 2.5	<i>Dot Overlay Assays</i> von Profilinen mit <i>in vitro</i> -translatierten Cnx1-Varianten	21
Abb. 2.6	ELISA von immobilisierten Profilinen und Cnx1	22
Abb. 2.7	Sequenzalignment von GABARAP (<i>H. sapiens</i>), APG8 (<i>S. cerevisiae</i>) und <i>A. thaliana</i> APG8-Proteinen	23
Abb. 2.8	Übersicht der verschiedenen APG8-Konstrukte	25
Abb. 2.9	Aufreinigung von APG8h und APG8i <i>His-Tag</i>	26
Abb. 2.10	<i>Dot Overlay Assays</i> von APG8h/APG8i und Cnx1-Varianten	27
Abb. 2.11	<i>Pull Down Assays</i> von <i>in vitro</i> -translatierten APG8-Proteinen mit Cnx1- <i>Intein</i>	29
Abb. 2.12	<i>Dot Overlay Assays</i> von Cnx6/Cnx7 mit <i>in vitro</i> -translatierten Cnx1-Varianten	31
Abb. 2.13	Aufreinigung des L12-Proteins und <i>Dot Overlay Assays</i> mit Cnx1-Varianten	32
Abb. 2.14	Prinzip des USPS <i>Two Hybrid Screens</i>	34
Abb. 2.15	Plasmid-Karten des USPS- <i>Bait</i> -Vektors pMet Cnx1 C _{ub} R-URA3 sowie des <i>Prey</i> -Vektors pN _{ub}	35
Abb. 2.16	Schema der beschleunigten Charakterisierung von positiven USPS-Klonen unter Verwendung der <i>Yeast Colony PCR</i> und RFLP-Analyse	40
Abb. 2.17	Transfektion humaner HEK293-Zellen mit GFP-Cnx1	44
Abb. 2.18	Schema der DsRed-fusionierten potentiellen Liganden und GFP-Cnx1	45

Abb. 2.19	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektion humaner HEK293-Zellen mit DsRed-gekoppelten putativen Cnx1-Interaktionspartnern sowie von Co-Transfektionen dieser Varianten mit GFP-Cnx1	46
Abb. 2.20	Schema der GFP-fusionierten potentiellen Liganden und DsRed-Cnx1	47
Abb. 2.21	Transfektion humaner HEK293-Zellen mit DsRed-Cnx1	48
Abb. 2.22	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektion humaner HEK293-Zellen mit GFP-gekoppelten putativen Cnx1-Interaktionspartnern sowie von Co-Transfektionen dieser Varianten mit DsRed-Cnx1	49
Abb. 2.23	Schema der <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Cnx1-Liganden	50
Abb. 2.24	Aufreinigung von <i>Intein</i> -Fusionen putativer Cnx1-Liganden	50
Abb. 2.25	<i>Pull Down Assays</i> mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten	51
Abb. 2.26	<i>Pull Down Assays</i> mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und <i>A. thaliana</i> Proteinrohextrakt	53
Abb. 2.27	<i>Pull Down Assays</i> mit <i>Intein</i> -Fusionen potentieller Liganden und <i>in vitro</i> -translatiertem Cnx1	54
Abb. 2.28	Schema der pGADT7-Konstrukte potentieller Cnx1-Liganden	55
Abb. 2.29	<i>Pull Down Assays</i> von <i>in vitro</i> -translatierten potentiellen Liganden mit Cnx1- <i>Intein</i>	55
Abb. 2.30	ELISA-Ansätze von putativen Liganden und Cnx1 bzw. Cnx1E	57
Abb. 3.1	Sequenzalignment des identifizierten CCH-Proteins aus <i>A. thaliana</i> mit seinen humanen bzw. Hefe-Homologen	70
Abb. 3.2	Sequenzalignment des identifizierten UreG-Proteins aus <i>A. thaliana</i> mit pflanzlichen und bakteriellen Homologen	72
Abb. 3.3	Sequenzalignment des identifizierten HIT-Proteins aus <i>A. thaliana</i> mit seinen humanen bzw. Hefe-Homologen	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Zusammenfassung der in den jeweiligen Vektoren verfügbaren Cnx1-Konstrukte	15
Tab. 2.2	Übersicht der im <i>Library Screen</i> ohne <i>Prey</i> -Induktion identifizierten Klone	37
Tab. 2.3	Übersicht der im <i>Library Screen</i> mit <i>Prey</i> -Induktion identifizierten einfach auftretenden Klone	41
Tab. 2.4	Übersicht der im <i>Library Screen</i> mit <i>Prey</i> -Induktion identifizierten mehrfach auftretenden Klone	42
Tab. 2.5	Für <i>Pull Down</i> -Experimente eingesetzte Mengen an <i>Intein</i> -Fusion putativer Cnx1-Liganden	50
Tab. 2.6	Ausbeuten an rekombinant exprimierten potentiellen Cnx1-Liganden nach <i>Intein</i> -Spaltung	56
Tab. 3.1	Zusammenfassung der für potentielle Interaktionspartner erhaltenen experimentellen Hinweise auf Cnx1-Bindung	67
Tab. 4.1	Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Organismen-Stämme	79
Tab. 4.2	Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide	80

Abkürzungen

A	Adenin	max.	maximal
ABA	Abscisinsäure	MeOH	Methanol
Abb.	Abbildung	min	Minute
AK	Antikörper	mind.	mindestens
amp	Ampicillin	mM	Millimolar
AMP	Adenosinmonophosphat	Mo	Molybdän
AO	Aldehydoxidase	Moco	Molybdäncofaktor
AP	Alkalische Phosphatase	MPT	Molybdopterin
AS	Aminosäuren	mRNA	<i>messenger</i> RNA
ATP	Adenosintriphosphat	MW	Molekulargewicht
bp	Basenpaare	N ₂	flüssiger Stickstoff
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- Phosphat-p-Toluidin-Salz	NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduziert)
BSA	Rinderserumalbumin	NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
bzw.	beziehungsweise	nm	Nanometer
ca.	circa	NR	Nitratreduktase
C	Cytidin	OD	optische Dichte
Ci	Curie	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
cDNA	komplementäre DNA	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat	PEG	Polyethylenglykol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	pmol	Picomol (Stoffmenge)
dest.	destilliert	PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat	RFLP	Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus
d. h.	das heisst	RNA	Ribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	Umdrehungen pro Minute
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol	SO	Sulfitoxidase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	T	Thymidin
EtOH	Ethanol	Tab.	Tabelle
evtl.	eventuell	TE	Tris-EDTA-Puffer
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>	U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung	UE	Untereinheit
G	Guanosin	ÜN	Übernachtkultur
ggf.	gegebenenfalls	u. U.	unter Umständen
h	Stunde	V	Volt
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid	v/v	Volumen zu Volumen-Verhältnis
kan	Kanamycin	Vol.	Volumen
kb	Kilobasenpaare	W	Watt
kDa	Kilodalton	WT	Wildtyp
Konz.	Konzentration	w/v	Masse zu Volumen-Verhältnis
l, ml, µl	Liter, Mililiter, Mikroliter	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D- galaktopyranosid
LB	Luria Broth	XDH	Xanthindehydrogenase
Lp	Ladepuffer	XO	Xanthinoxidase
M	Mol (Konzentration)	YTH	<i>Yeast Two Hybrid</i>
mA	Miliampere	z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Artnamen

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. pasteurii</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>

1. Einleitung

1.1 Die biologische Bedeutung des Spurenelements Molybdän

Molybdän (Mo) ist ein Element der 6. Nebengruppe des Periodensystems und zählt als einziges aus der zweiten Reihe der Übergangsmetalle zu den biologisch aktiven Spurenelementen. Es spielt in der katalytisch wirksamen Form des Molybdäncofaktors (Moco) sowohl im pro- als auch im eukaryotischen Stoffwechsel eine bedeutende Rolle, für letzteren ist es sogar essentiell erforderlich. Die Bedeutung von Mo für den Metabolismus von Mikroorganismen wurde bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts erkannt (Bartels, 1930). Hinweise auf den unverzichtbaren Charakter von Mo für den Stoffwechsel höherer Organismen wurden aufgrund dessen ausreichender Verfügbarkeit innerhalb der Nahrungskette erst später beschrieben. Dabei handelte es sich zunächst um Anzeichen von Mo-Defizienz bei Nutzpflanzen (Review in Gupta, 1997), die auf einen Verlust der Nitratreduktase- (NR) Aktivität zurückgeführt werden konnten. Die NR katalysiert die Schlüsselreaktion der anorganischen Stickstoff- (N) Assimilation und ist damit für Pflanzen lebenswichtig, sofern diese nicht auf anderem Wege mit reduzierten N-Substraten versorgt werden (durch Aufnahme von Ammoniumverbindungen oder prokaryotische N-Fixierung). Als weitere Mo-Enzyme höherer Pflanzen konnten die am Purinkatabolismus beteiligte Xanthindehydrogenase (XDH) und die Aldehydoxidasen (AO) identifiziert werden. Für AO's wurde eine Funktion im Phytohormon-Stoffwechsel nachgewiesen, indem gezeigt werden konnte, dass sie den jeweils letzten Schritt in der Biosynthese von Indolyllessigsäure (Koshiba *et al.*, 1996) und Abscisinsäure (Walker-Simmons *et al.*, 1989, Taylor, 1991, Seo *et al.*, 2000) katalysieren. Erst kürzlich wurde mit der Sulfitoxidase (SO) ein viertes pflanzliches Mo-Enzym entdeckt (Eilers *et al.*, 2001). Die Relevanz der SO für den tierischen Organismus ist bekannt, in Pflanzen konnte ihr jedoch noch keine physiologische Rolle zugeordnet werden.

Die Bedeutsamkeit von Mo für Tiere und den Menschen konnte erstmals durch Westerfeld & Reichert (1949) gezeigt werden. Sie entdeckten einen Faktor, welcher als Molybdätsalz essentiell für die enzymatische Aktivität der Xanthinoxidase (XO) in Leber und Magen von Ratten ist. Dies galt zugleich als erster Hinweis auf die Assoziation von Mo mit einem Enzym. In den folgenden Jahren wurde die Mo-Enzym-Interaktion für die NR aus *Neurospora crassa* (Nicholas & Nason, 1954), die tierische AO (Mahler *et al.*, 1954) und die tierische SO (Cohen *et al.*, 1971) beschrieben.

1.2 Die Entdeckung des Molybdäncofaktors

Durch die Arbeiten von Pateman *et al.* (1964) ergaben sich erste Hinweise auf das Vorkommen eines einheitlichen Mo-assoziierten Enzym-Cofaktors. Sie waren in der Lage, *Aspergillus nidulans*-Mutanten zu isolieren, die einen simultanen Verlust von NR- und XDH-Aktivität zeigten. Da die einzige Gemeinsamkeit der Mutanten im Ausfall dieser beiden Mo-abhängigen Enzyme bestand, wurde daraus die Theorie abgeleitet, dass beide Enzyme einen gemeinsamen Mo-haltigen Cofaktor besitzen, der in den Mutanten nicht mehr gebildet werden konnte. Diesen bezeichneten sie als Molybdäncofaktor (Moco) und die an dessen Biosynthese beteiligten Genloci als „*cnx*“ für „*c*ofactor for *n*itrate reductase and *x*anthin dehydrogenase“. Diese Namensgebung wurde später auch für Pflanzen beibehalten, wohingegen für die entsprechenden bakteriellen Loci die Operon-Bezeichnungen "*moa*, *mob*, *mod*, *moe* und *mog*" sowie für Säuger die Bezeichnung "*mocs*" (*m*olybdenum *c*ofactor *s*ynthesis) eingeführt wurden. Der funktionelle Beweis, dass der Molybdäncofaktor auch zwischen verschiedenen Organismen austauschbar ist, wurde erstmals von Nason *et al.* (1971) geführt und geht auf Versuche mit der pleiotropen *nit-1*-Mutante aus *N. crassa* zurück (Sorger & Giles, 1965). Die *nit-1*-Mutante ist nicht in der Lage, aktiven Moco zu synthetisieren und enthält daher inaktives NR-Apoprotein. Nason *et al.* (1971) zeigten, dass dessen Aktivität rekonstituierbar ist, wenn die niedermolekulare Fraktion denaturierter Mo-Enzyme pflanzlicher, tierischer oder bakterieller Herkunft zugesetzt wurde. Diese Rekonstitution der *nit-1*-Mutante findet seitdem als sogenannter *nit-1*-Test Anwendung in der Erforschung der Moco-Biosynthese. Der einzige bisher bekannte Fall für die Nicht-Rekonstitution eines Mo-Enzyms im *nit-1*-Test ist die für die prokaryotische N-Fixierung essentielle Nitrogenase, die einen Eisen-Schwefel-Molybdäncofaktor (Fe-S-Moco) enthält (Pienkos *et al.*, 1977, Ludden *et al.*, 1993).

Bis zum heutigen Tag konnten mehr als 50 Enzyme aus allen Organismenreichen isoliert werden, die das Metall Mo in gebundener Form (Moco) für die Katalyse verschiedenster Oxidations- und Reduktionsreaktionen benötigen (Hille, 1996a, Hille, 1996b, Kisker *et al.*, 1997, Hille, 2002). Die grosse Mehrheit ist dabei prokaryotischen Ursprungs, während nur eine vergleichsweise geringe Anzahl unter Eukaryoten zu finden ist. Einige Archaea kombinieren dabei das Pterin-Gerüst des Moco mit einem Wolfram-Atom anstelle des Mo's (Wolfram-Cofaktor; Chan *et al.*, 1995).

1.3 Die Struktur des Molybdäncofaktors

Aufgrund der ausgesprochen labilen Natur des Moco's und seiner extremen Sensitivität gegenüber Sauerstoff musste ein Grossteil der Strukturanalyse an stabilen Degradations- und Oxidationsprodukten durchgeführt werden. Zunächst konnte durch Charakterisierung des Moco's aus XO, SO und NR ein Pterin als strukturelle organische Komponente des Moco's identifiziert werden (Johnson *et al.*, 1980). Mit Hilfe der beiden Moco-Oxidationsprodukte Form A und Form B wurde wenig später auch die Präsenz einer vier C-Atome umfassenden Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester am C6'-Atom der Pterin-Komponente festgestellt (Johnson *et al.*, 1984). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Form B und dem natürlichen Metaboliten Urothion (Goto *et al.*, 1969) ließen Johnson *et al.* (1982) ferner auch auf die Gegenwart von Schwefel-Gruppen im Moco schließen, was durch die Empfindlichkeit des Moco's gegenüber Sulfhydrylverbindungen sowie durch seine Stabilisierung in Gegenwart von reduzierenden Agenzien untermauert wurde (Alikulov & Mendel, 1984). Tatsächlich ergab die strukturelle Charakterisierung des Cofaktors nach Behandlung mit thiol-spezifisch alkylierendem Iodoacetamid das Vorhandensein zweier Thiole am C1'- und C2'-Atom der Seitenkette, die zusammen eine Dithiolengruppe ausbilden (Kramer *et al.*, 1987). Ein auf der Basis dieser Daten erstelltes Modell der Struktur des aktiven Moco's schlug die Assemblierung des Mo-Atoms an eine bizyklische 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Komponente über die Dithiolengruppe sowie die Bindung zweier weiterer Liganden an das Mo-Atom vor (Kramer *et al.*, 1987).

Die Mo-enthaltende, aktive Form des Molybdäncofaktors wurde als Moco, die Mo-freie, inaktive Form hingegen als Molybdopterin (MPT) bezeichnet. Jedoch konnte erst 1995 anhand der ersten Kristallstruktur eines Mo-Enzyms, der Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* (Romao *et al.*) die Richtigkeit dieses Moco-Struktur-Modells überprüft werden. Mit einer einzigen Abweichung, nämlich der Ausbildung eines Pyranorings zwischen dem C3'-Atom der Seitenkette und dem C7'-Atom des Pterins zu einem trizyklischen Ringsystem, war die bis dahin angenommene Struktur korrekt abgeleitet worden. Das Vorliegen des nativen Moco's als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin wurde später durch die Aufklärung der Strukturen weiterer bakterieller Mo-Enzyme bestätigt (Schindelin *et al.*, 1996, Boyington *et al.*, 1997). Basierend auf den Erkenntnissen, dass die *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* sowohl durch prokaryotischen als auch durch eukaryotischen Moco komplementiert werden kann, wurde diese Struktur als unter allen Organismen konserviert vorgeschlagen. Wie jedoch gezeigt werden konnte, assoziiert der

Moco eubakterieller Mo-Enzyme ein Nukleotid (GMP oder CMP) über eine Pyrophosphatbindung an das C4'-Atom der Seitenkette des MPT's (Johnson *et al.*, 1990) und weicht insofern von der Struktur des eukaryotischen Moco's ab. Da diese Variationen jedoch die Grundstruktur des Cofaktors nicht in Frage stellen, kann weiterhin von einer unter allen Organismen konservierten Struktur des Moco's ausgegangen werden.

1.4 Die Synthese des Molybdäncofaktors

Die Untersuchung der Molybdäncofaktor-Biosynthese bekam ihre entscheidenden Impulse durch die Charakterisierung pleiotroper Mo-Enzym-Mutanten von *E. coli*. Ursprünglich wurden diese Mutanten mit *chl* bezeichnet, da sie über Chloratresistenz selektiert wurden. Dieses Selektionsprinzip beruht auf der Fähigkeit der Moco-abhängigen NR, neben der Umsetzung von Nitrat zu Nitrit auch die Reaktion von Chlorat zu Chlorit katalysieren zu können, welches für Bakterien wie Eukaryoten gleichermassen toxisch ist. Zur Abgrenzung von nicht pleiotropen Mutanten wurde die Bezeichnung *mo* für bakterielle Moco-Mutanten eingeführt, ein dritter Buchstabe kennzeichnet das Operon (Shanmugan *et al.*, 1992). Die Strukturen der wichtigsten Operon-Systeme wurden geklärt und die beteiligten Gene sequenziert. Rajagopalan *et al.* (1992) zeigten zusammenfassend, dass insgesamt 15 Gene (organisiert in fünf *mo*-Operons) an der Synthese des Moco's in *E. coli* beteiligt sind. Die Biosynthese lässt sich dabei in vier Abschnitte unterteilen. Zuerst wird aus einem Guanosinderivat der schwefelfreie Precursor Z generiert, dieser wird im zweiten Schritt durch Übertragung zweier Schwefelatome zu MPT umgewandelt. Im dritten Schritt der Moco-Biosynthese erfolgt die Insertion des Mo-Atoms, wodurch aktiver Moco entsteht. Einige Mo-Enzyme (XDH, AO) sind auf die Substitution eines der Sauerstoff-Liganden des Mo's durch ein Schwefelatom angewiesen, was in einem optionalen vierten Schritt geschehen kann. Auf Prokaryoten beschränkt ist die Verknüpfung eines Nukleotids (in der Regel GMP) mit dem Phosphatrest des Cofaktors (MPT Guanin Dinukleotid, MGD). Die Intermediate der Moco-Biosynthese sowie die an den jeweiligen Katalyseschritten beteiligten Proteine sind in **Abb. 1.1** zusammenfassend dargestellt.

1.4.1 Der erste Schritt der Moco-Biosynthese- Bildung von Precursor Z

In Übereinstimmung mit der Biosynthese anderer Pterine wie der Flavine und Folate (Brown, 1985) wurde auch für den Moco-Stoffwechsel 5'-Guanosin-Triphosphat (5'-GTP) als Ausgangssubstanz angenommen. Diese Hypothese konnte jüngst durch Verwendung eines *in vitro*-

Systems zur Precursor Z-Synthese bestätigt werden (Hänzelmann *et al.*, 2004). Die Synthese der anderen Pterine wird durch Ring-Erweiterung am GTP unter Katalyse von Cyclohydrolasen initiiert. Die Analyse von GTP-Cyclohydrolase defizienten humanen Patienten zeigte volle Aktivität der Mo-Enzyme SO und XO, wodurch eine Überlagerung der frühen Biosyntheseschritte anderer Pterine mit der Moco-Biosynthese ausgeschlossen werden konnte (Niederwieser *et al.*, 1984). Alle Kohlenstoffatome radioaktiv markierten GTP's fanden sich nach *in vivo*-Synthese in aufgereinigtem Precursor Z wieder, dabei konnte das C8'-Atom des GTP's an der C2'-Position von Precursor Z lokalisiert werden (Wuebbens *et al.*, 1995). Dementsprechend wurde eine alternative, Cyclohydrolase-ähnliche Reaktion mit Umlagerung der Kohlenstoffseitenkette postuliert (Wuebbens *et al.*, 1995). Dabei wird der Imidazolring des Guanins hydrolysiert, nachfolgend kommt es zu einer Umlagerung der Ribose. Auf das C2'-Kohlenstoffatom des entstehenden Intermediats wird eine aus dem C8'-Kohlenstoff des Guanins hervorgegangene Formyl-Gruppe übertragen. Sie wird zwischen die C2'- und C3'-Position der Seitenkette inseriert. Nach Wassereliminierung wird der Pterin-Ring geschlossen und es entsteht ein phosphoryliertes Dihydropterin mit einer vier Kohlenstoff Atome umfassenden sechs-Alkyl-Seitenkette. Diese wird cyclisiert, wobei es zum Verlust zweier Phosphate der Seitenkette kommt. Precursor Z entsteht als erstes detektierbares Zwischenprodukt der Moco-Biosynthese. Kürzlich wurde durch Santamaria-Araujo *et al.* (2004) die exakte Struktur von Precursor Z publiziert. Sie konnten nachweisen, dass die Seitenkette des Pterins bereits zu einem Pyrano-Ring geschlossen ist und an ihrem C1'-Atom ein germinales Diol trägt.

In *E. coli* wird die Synthese von Precursor Z durch die Proteine MoaA und MoaC katalysiert, mit entsprechenden Homologen in *A. thaliana* und dem Menschen (Cnx2 und Cnx3 bzw. MOCS1A und MOCS1B; Hoff *et al.*, 1995 und Reiss *et al.*, 1998). Die Struktur von MoaA konnte durch Hänzelmann *et al.* (2004) gelöst werden. Das Protein gehört wie seine Homologen zur Familie der „Radikal-S-Adenosylmethionin- (SAM)“ Proteine (Sofia *et al.*, 2001) und zeichnet sich durch zwei Sauerstoff-labile Eisen-Schwefel-Cluster aus, die zur reduktiven Spaltung von SAM und Generierung radikalischer Intermediate benötigt werden. Die humanen MOCS1A- und MOCS1B-Proteine werden interessanterweise durch eine bicistronische Genstruktur codiert, wobei die Gene, von einem Stop-Codon unterbrochen, mittels eines gemeinsamen Transkripts exprimiert werden (Gross-Hardt & Reiss, 2002). Zunächst war angenommen worden, dass beide Proteine separat translatiert werden (Reiss *et al.*, 1998), inzwischen scheint aber klar, dass dies nur für MOCS1A zutrifft (Hänzelmann *et al.*, 2002), während MOCS1B aufgrund alternativen *Splicings* offenbar nur als Fusion mit inaktivem MOCS1A vorkommt (Gray & Nicholls, 2000). Der Funktionsverlust des MOCS1A-Anteils im Fusionsprotein konnte dabei auf das Fehlen des konservierten C-terminalen Doppel-Glycin-Motivs zurückgeführt werden (Hänzelmann *et al.*, 2002).

1.4.2 Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese-Konversion zu MPT

Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese besteht in der Umwandlung von Precursor Z zu MPT. Dabei werden zwei Schwefel-Atome auf den Precursor übertragen, wodurch eine Dithiolengruppe entsteht, die zur späteren Koordination des Mo's benötigt wird. Diese Reaktion wird von der MPT-Synthase katalysiert, einem heterotetrameren Proteinkomplex aus zwei kleinen und zwei grossen Untereinheiten (Pitterle & Rajagopalan, 1993). In *E. coli* setzt sich die MPT-Synthase aus den Proteinen MoaD (8,75 kDa) und MoaE (16,85 kDa) zusammen. Für die Funktion der MPT-Synthase ist eine Aktivierung durch das MoeB-Protein erforderlich (Johnson & Rajagopalan, 1987a, 1987b). Durch Pitterle *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, dass *in vitro* allein MPT-Synthase und Precursor Z zur Bildung von MPT ausreichend sind. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die kleine Untereinheit (MoaD) den Schwefel trägt, da MoaD anders als MoaE gegenüber Sulfhydrylreagenzien wie Iodoacetamid und N-Ethylmaleimid sensitiv ist. Anhand inaktiver MPT-Synthase, aufgereinigt aus einer *E. coli moeB*-Mutante, konnte für MoaD massenspektrometrisch eine Abweichung von 16 Da ermittelt werden, was der Substitution eines Sauerstoffs gegen einen Schwefel entsprechen würde (Pitterle & Rajagopalan, 1993). Rudolph *et al.* (2001) waren in der Lage, die Struktur der prokaryotischen MPT-Synthase zu lösen, während durch Gutzke *et al.* (2001) die Formation eines Thiocarboxylats am C-terminalen Doppel-Glycin-Motiv von MoaD nachgewiesen sowie eine sukzessive Übertragung der Schwefelatome auf Precursor Z über ein nur ein Schwefel tragendes Intermediat („Precursor G“) vorgeschlagen wurde. Die Existenz dieses Intermediates wurde durch Wuebbens *et al.* (2003) experimentell bestätigt.

Da MoeB-defiziente *E. coli*-Stämme keine aktive MPT-Synthase besitzen und darüber hinaus Precursor Z akkumulieren wurde vermutet, dass MoeB als Sulfurase den Schwefel auf die MPT-Synthase übertragen könnte. In der Folgezeit wurde nachgewiesen, dass MoeB tatsächlich für die MPT-Synthase-Funktion erforderlich ist. Dabei wird die kleine Untereinheit vor der eigentlichen Schwefelübertragung aktiviert, indem es unter ATP-Verbrauch zur Ausbildung eines Acyl-Adenylats am C-Terminus von MoaD kommt (Leimkühler *et al.*, 2001). Lake *et al.* (2001) konnten die Kristallstruktur des MoeB-MoaD-Komplexes aufklären, es gab jedoch keine Hinweise darauf, dass MoeB neben der Adenylierung auch für die eigentliche Sulfurierung der MPT-Synthase verantwortlich ist. Durch Mutationsanalysen aller konservierten MoeB-Cystein-Reste konnte MoeB als MPT-Synthase-Sulfurase ausgeschlossen werden. Dagegen wurde es möglich, zu zeigen, dass *in vitro* verschiedene Cystein-Desulfurasen wie IscS zur Schwefelübertragung auf die kleine Untereinheit der MPT-Synthase befähigt sind (Leimkühler *et al.*, 2001).

Im humanen System entsprechen die Proteine MOCS2A und MOCS2B der kleinen bzw. grossen Untereinheit der MPT-Synthase. Ähnlich den für den ersten Schritt der Moco-Biosynthese codierenden Genen (*mocs1A* und *mocs1B*) werden auch *mocs2A/mocs2B* bicistronisch exprimiert (Stallmeyer *et al.*, 1999a), es konnte jedoch gezeigt werden, dass MOCS2A und MOCS2B auch als separate Proteine translatiert werden. Der hohe Grad der Konservierung der Moco-Biosynthese wird dadurch deutlich, dass *in vitro* sowohl MoeD/MOCS2A als auch MoeE/MOCS2B funktionell äquivalent sind (Leimkühler *et al.*, 2003). Das zu MoeB homologe humane Protein ist MOCS3. Es verfügt neben einer N-terminalen MoeB-artigen Domäne auch über einen C-terminalen Bereich, der Übereinstimmungen mit Rhodanesen aufweist, dabei handelt es sich um Sulfurtransferasen, die *in vitro* den Schwefel-Transfer von Thiosulfat auf Cyanid katalysieren. Jüngst wurde durch Matthies *et al.* (2004) bewiesen, dass MOCS3 neben der Adenylierung der kleinen Untereinheit als Funktion seiner Rhodanese-artigen Domäne auch die Schwefelübertragung und somit die Sulfurierung der MPT-Synthase vermittelt. Im pflanzlichen System setzt sich die MPT-Synthase aus Cnx6 (grosse Untereinheit; Nieder *et al.*, 1999) und Cnx7 (kleine Untereinheit; Mendel & Schwarz, 2002) zusammen, während das Cnx5-Protein (Nieder *et al.*, 1997) wie MOCS3 als MPT-Synthase-Sulfurase wirken dürfte.

1.4.3 Der dritte Schritt der Moco-Biosynthese-Insertion des Molybdäns

Im dritten Schritt der Moco-Biosynthese wird das katalytisch wirksame Mo-Atom auf MPT übertragen, wodurch das Metall in die biologisch aktive Form des Molybdäncofaktors überführt wird. In *E. coli* sind die Proteine MoeA und MogA für die Mo-Insertion erforderlich. Aus Arbeiten mit *mogA*-Mutanten ergaben sich Hinweise auf die Beteiligung dieses Locus an der Moco-Biosynthese, da entsprechende *E. coli*-Stämme MPT akkumulieren und nicht zur Bildung des Molybdäncofaktors befähigt sind, aber nach Zugabe unphysiologisch hoher Molybdätkonzentrationen aktive Mo-Enzyme aufweisen (Steward & MacGregor, 1982, Joshi *et al.*, 1996). Ein vergleichbares Phänomen wurde auch für andere Organismen beschrieben, so haben Mutanten des *cnxE*-Locus in *Aspergillus nidulans* (Arst *et al.*, 1970), die *nit-9-ABC*-Mutante aus *Neurospora crassa* (Dunn-Coleman, 1984), der *cnxA*-Locus in *Nicotiana tabacum* (Mendel *et al.*, 1981), der *chl6*-Locus aus *Arabidopsis thaliana* (Stallmeyer *et al.*, 1995) und eine Mutante der murinen Fibroblasten-Zelllinie L929 (Falciani *et al.*, 1994) ebenfalls einen molybdätreparablen Phänotyp.

In Pflanzen konnte das Cnx1-Protein dem dritten Schritt der Moco-Biosynthese zugeordnet werden (Stallmeyer *et al.*, 1995, Schwarz *et al.*, 2000), während im humanen System das ursprünglich als Neurorezeptor-Ankerprotein beschriebene Gephyrin (Kirsch *et al.*, 1993) die Mo-

Insertion katalysiert (Stallmeyer *et al.*, 1999b). Sowohl Cnx1 als auch Gephyrin stellen Fusionsproteine aus einem MoeA- und einem MogA-homologen Bereich dar, welche als E- bzw. G-Domäne bezeichnet werden. Die eukaryotischen G-Domänen komplementieren bei heterologer Expression den molybdatreparablen Phänotyp von *mogA*-Mutanten, dagegen können die E-Domänen eine Defizienz im MoeA-Protein, für das Hasona *et al.* (1998) erstmals eine Rolle in der Aktivierung bzw. Prozessierung von Molybdat postulierten, funktionell nicht rekonstituieren. Dies liegt möglicherweise daran, dass bei vielen Prokaryoten zwei Moleküle MPT durch ein zentrales Mo-Atom koordiniert werden und den eukaryotischen E-Domänen die Fähigkeit zur Synthese dieses sog. Bis-Moco fehlt.

Inzwischen konnten die Kristallstrukturen von MogA (Liu *et al.*, 2000), Cnx1G (Schwarz *et al.*, 2001) und GephyrinG (Sola *et al.*, 2001, Schwarz *et al.*, 2001) sowie MoeA (Xiang *et al.*, 2001) und GephyrinE (Sola *et al.*, 2004) gelöst werden. Durch Arbeiten mit dem Cnx1-Protein bzw. seinen separat exprimierten Domänen wurden detaillierte Einsichten in die Teilreaktionen des dritten Schritts der Moco-Biosynthese gewonnen. Die Co-Kristallisation und Strukturaufklärung von Cnx1G in Verbindung mit MPT (Kuper *et al.*, 2004) gab nicht nur Aufschluss über die Beschaffenheit des Enzym-Substrat-Komplexes, sondern führte darüber hinaus auch zu zwei völlig unerwarteten Entdeckungen. Das Cnx1G-gebundene MPT war über eine Phosphodiester-Bindung mit einem AMP-Molekül verbunden und lag somit als adenyliertes MPT vor (MPT-AMP). Desweiteren konnte ein Kupfer-Atom als Ligand der MPT-Dithiolengruppe identifiziert werden. Angesichts dieser Tatsache und der Beobachtung einer Kupfer-Inhibition der Funktion von Cnx1G kann damit von einer Verbindung zwischen Molybdän- und Kupferstoffwechsel ausgegangen werden. Llamas *et al.* (2004) konnten die MPT-Adenylierung durch Cnx1G mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten demonstrieren und nachweisen, dass diese Reaktion von der Gegenwart von ATP und Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) abhängig ist. Entscheidende Fortschritte wurden auch im Hinblick auf die E-Domänenfunktion von Cnx1 gemacht. Cnx1E bindet *in vitro* Molybdat und MPT-AMP in äquimolaren Mengen und katalysiert die Hydrolyse von MPT-AMP in einem Molybdat- und Zn^{2+}/Mg^{2+} -abhängigen Prozess, der mit einer stöchiometrischen Freisetzung von Moco sowie AMP und Kupfer einhergeht (Llamas *et al.*, 2005).

1.4.4 Der vierte Schritt der Moco-Biosynthese-Modifikationen des Molybdäncofaktors

Bereits vor der Beschreibung des Moco's wurde erkannt, dass die Mo-Enzyme XO aus Kuhmilch sowie XDH und AO aus Hühnchen-Leber durch Behandlung mit Cyanid (CN^-) inaktiviert werden können (Massey & Edmondson, 1970). Dabei wird den Proteinen ein Schwefel-Atom entfernt, welches als Thiocyanat (SCN^-) gebunden wird und quantitativ nachgewiesen werden

kann. Später konnten Wahl & Rajagopalan (1982) zeigen, dass dieser sogenannte cyanolysierbare Schwefel weder dem jeweiligen Apo-Protein noch der Pterin-Komponente des Cofaktors entstammt, sondern anorganischer Natur sein muss. Sie postulierten die Ligandierung des Schwefels an das Mo-Atom des Moco's. Es ergab sich, dass jedoch nicht alle Mo-Enzyme auf eine Sulfurierung des Cofaktors angewiesen sind. So können NR und SO als sog. Dioxo-Mo-Hydroxylasen den Moco im Anschluss an den dritten Biosyntheseschritt (**1.4.3**) direkt als katalytisch aktive Komponente übernehmen. Dagegen benötigen die Monooxo-Mo-Hydroxylasen XDH und AO die beschriebene Substitution eines Sauerstoff- gegen einen Schwefel-Liganden am Mo-Atom. Diese Reaktion wird im vierten Schritt der Moco-Biosynthese durch ein sogenanntes Moco-Sulfurase-Protein katalysiert. In *Arabidopsis thaliana* wurde mit der *aba3*-Mutante (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996, Schwartz *et al.*, 1997) ein Phänotyp beschrieben, dessen Merkmale auf die Reduktion des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) zurückgeführt werden konnten. Für den letzten Biosyntheseschritt von ABA ist die Monooxo-Mo-Hydroxylase AO verantwortlich. Durch Bittner *et al.* (2001) wurde das ABA3-Protein als pflanzliche Moco-Sulfurase identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus einer N-terminalen NifS-ähnlichen Domäne, welche als Cystein-Desulfurase den Schwefel auf den Moco überträgt, und einer C-terminalen Domäne mit Homologie zu Transkriptionsfaktoren, deren Funktion noch wenig verstanden ist. Für den Menschen konnte mit dem HMCS-Protein (human molybdenum cofactor sulfurase; Ichida *et al.*, 2001) ein Äquivalent zum pflanzlichen ABA3 beschrieben werden, während bei Prokaryoten bisher noch keine Moco-Sulfurase-Mutanten bekannt sind, obwohl diese durchaus über Monooxo-Mo-Hydroxylasen wie die XDH verfügen (Leimkühler *et al.*, 1998).

Ein rein prokaryotisches Phänomen besteht in der Verknüpfung des Cofaktors mit einem GMP-Nukleotid. Dabei wird der bakterielle Bis-Moco (**1.4.3**) durch die Funktion des MobA-Proteins (Lake *et al.*, 2000, Guse *et al.*, 2003) in einem 5'-GTP- und Mg^{2+} -abhängigen Prozess zum sog. Bis-MPT Guanin Dinukleotid (Bis-MGD) modifiziert. Eine Ausnahme stellt die CO-Dehydrogenase dar, die ein MPT Cytosin Dinukleotid (MCD) zur katalytischen Reduktion von Kohlenmonoxid benötigt (Volk *et al.*, 1994, Hänzelmann & Meyer, 1998).

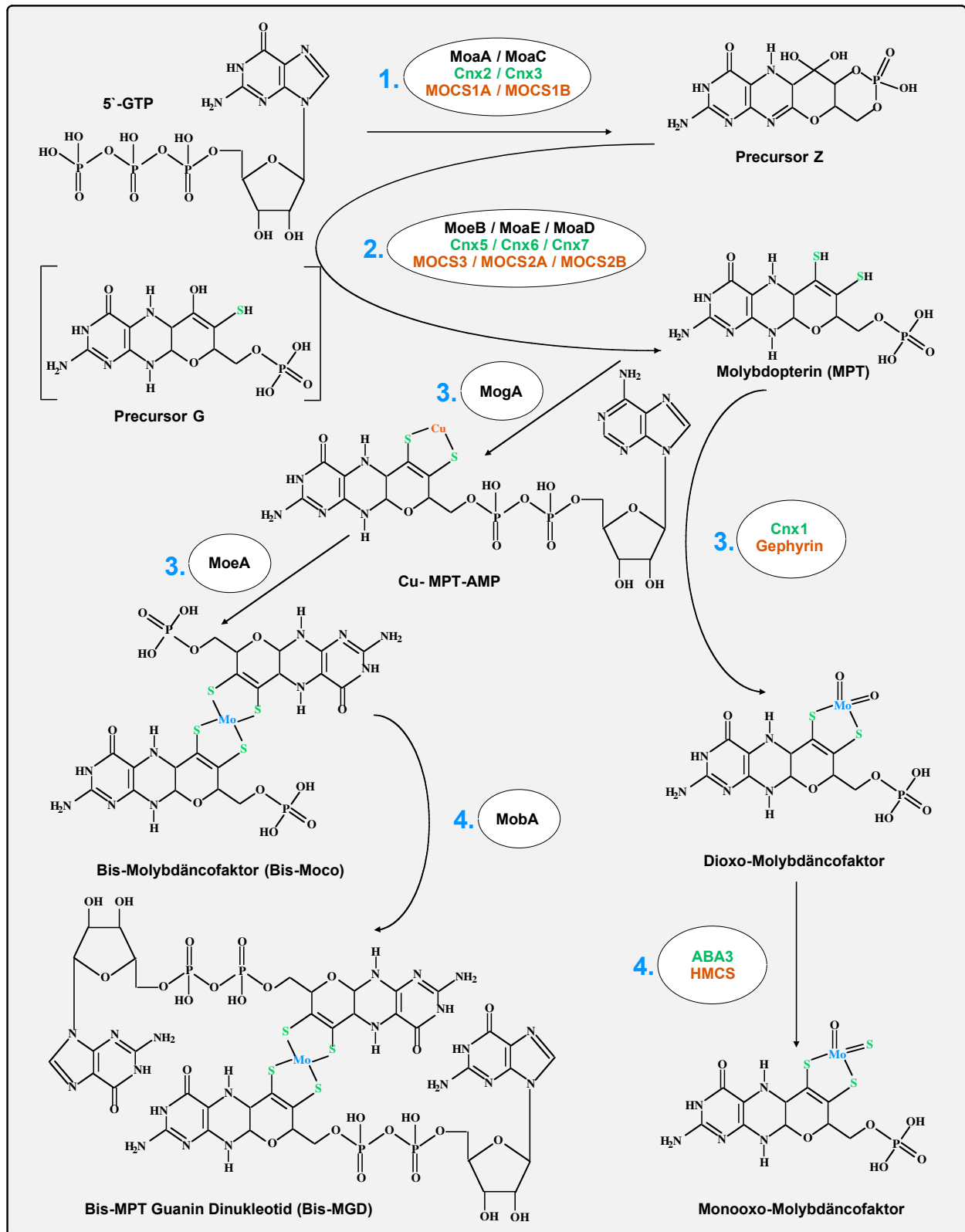


Abb. 1.1 Die vier Schritte der Molybdäncofaktor-Biosynthese. Gezeigt sind die wichtigsten Intermediate der Moco-Biosynthese sowie die an der Katalyse des jeweiligen Schrittes beteiligten Proteine aus *E. coli* (schwarz), *A. thaliana* (grün) und dem Menschen (rot), wie in 1.4.1-1.4.4 beschrieben.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche Interaktionspartner des Cnx1-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren. Cnx1 katalysiert mit der Mo-Insertion den dritten Schritt der Moco-Biosynthese im pflanzlichen System (1.4.3) und ist das Homologe zum menschlichen Gephyrin, mit dem es auch den strukturellen Aufbau aus E- und G-Domäne teilt. Im Vergleich zu Cnx1 (E-Domäne N-terminal, G-Domäne C-terminal) ist die Domänenanordnung im Fall von Gephyrin invertiert, die Domänen selbst besitzen aber hochgradige Sequenzübereinstimmung. Dies geht zum Beispiel daraus hervor, dass durch heterologe Expression von Gephyrin eine pflanzliche *cnx1*-Mutante funktionell vollständig rekonstituiert werden kann (Schwarz *et al.*, 2000). Umgekehrt war es auch möglich, eine auf der Gephyrin-defizienten Zelllinie L929 basierende Knock-out Maus durch Expression von Cnx1 bezüglich der Moco-Biosyntheseaktivität zu komplementieren (Grosskreutz *et al.*, 2003). Gephyrin wurde ursprünglich als Verankerungsprotein für Neurorezeptoren beschrieben und ist von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung inhibitorischer Synapsen im Zentralnervensystem (Kirsch *et al.*, 1991, Kirsch *et al.*, 1993). Erst später wurde die zweite Funktion des Proteins in der Moco-Biosynthese erkannt (Stallmeyer *et al.*, 1999b).

Synaptische Inhibition kontrolliert die Erregbarkeit von Neuronen; eine Störung dieses Systems hat oft komplexe neurologische Fehlfunktionen wie Epilepsie und Hyperekplexie zur Folge. Inhibitorische Glycin- (GlyR) und γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA-R) gehören zur Superfamilie der Liganden-gesteuerten pentameren Ionenkanäle und sind mit Cytoskelett-bindenden Proteinen assoziiert. Gephyrin bindet sowohl an Mikrotubuli (Kirsch *et al.*, 1991) als auch an den cytoplasmatischen Loop der β -Untereinheit des GlyR (Kneussel & Betz, 2000) und stellt damit eine Verbindung zwischen den membrangebundenen Ionenkanälen und dem subsynaptischen Cytoskelett dar („Gephyrin“ wurde abgeleitet von „Gejura“, griechisch für Brücke). Darüber hinaus ist Gephyrin auch an der Clusterung von GABA-Rezeptoren beteiligt (Essrich *et al.*, 1998), es konnte aber keine direkte Wechselwirkung nachgewiesen werden (Kneussel *et al.*, 2001, Levi *et al.*, 2004).

Neben seiner Funktion bei der Verankerung von Ionenkanälen steht Gephyrin mit weiteren Interaktionspartnern in Wechselwirkung. Das GABA-Rezeptor assoziierte Protein GABARAP (Kneussel *et al.*, 2000) bindet sowohl an die $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA-Rezeptors als auch an Gephyrin; einen ternären Komplex scheint es jedoch nicht zu geben. Weiterhin interagiert Gephyrin mit Collybistin (Kins *et al.*, 2000), einem neuronalen Nukleotid-Austauschfaktor, der an G-Proteinen der rho-/rac-Familie (CDC42) wirkt und dadurch indirekt die Mikrofilament-Dynamik beeinflusst. Daneben stellt die Wechselwirkung mit dem G-Aktin bindenden Protein Profilin (Giesemann *et al.*, 2003) eine weitere Verbindung zum Mikrofilament-System dar. Die

Interaktion mit dem Motorprotein Dynein (Fuhrmann *et al.*, 2002) könnte am aktiven Transport von Gephyrin und assoziierten Rezeptoren beteiligt sein (Hanus *et al.*, 2004). Schliesslich bindet Gephyrin an RAFT1 (Sabatini *et al.*, 1999), eine Protein-Kinase der ATM-Superfamilie, die in die neuronale Translations-Regulation involviert ist. Gephyrin wird jedoch nicht nur in neuronalem Gewebe exprimiert; es wurden 11 verschiedene, alternativ gespleisste Gephyrin-Formen identifiziert, deren Expression gewebespezifisch reguliert wird (Prior *et al.*, 1992, Ramming *et al.*, 2000, Meier *et al.*, 2000). Die Lokalisierung von Gephyrin sowie die Wechselwirkungen mit seinen bekannten Interaktionspartnern sind in **Abb. 1.2** dargestellt.

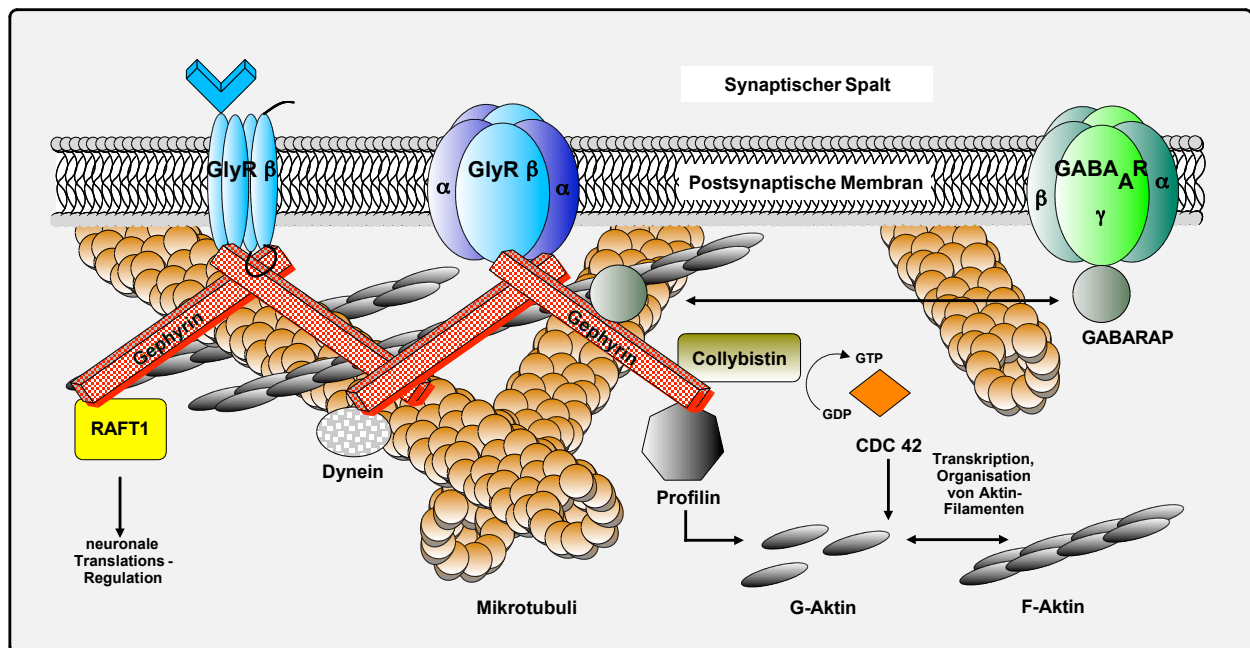


Abb. 1.2 Modell der Gephyrin-Lokalisierung in neuronalen Zellen. Dargestellt sind die Gephyrin-vermittelte Clusterung inhibitorischer Neurorezeptoren, deren Verbindung mit dem subsynaptischen Cytoskelett sowie die weiteren bekannten Gephyrin-Interaktionspartner.

Im Gegensatz zum detailliert untersuchten Gephyrin konnten für das pflanzliche Homologe Cnx1 mit Ausnahme von Aktinfilamenten (Schwarz *et al.*, 2000) bisher keine interagierenden Proteine nachgewiesen werden. Aufgrund der Vielzahl der für Gephyrin bekannten Protein-Wechselwirkungen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch Cnx1 Ziel bisher noch unbekannter Interaktionspartner ist; diese zu identifizieren war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei sollten zum einen gezielt pflanzliche Homologe bekannter Gephyrin-bindender Proteine bzw. Proteine aus der Moco-Biosynthese auf Wechselwirkung mit Cnx1 untersucht werden, zum anderen aber auch ergebnisoffene Screens durchgeführt werden. In *Arabidopsis thaliana* gibt es Homologe zu Profilin (Huang *et al.*, 1996), GABARAP (APG8-Proteine, Doelling *et al.*, 2002, Ketelaar *et al.*, 2004) und RAFT1 (pTOR, Menand *et al.*, 2002). Auch eine Wechselwirkung mit Mikrotubuli, wie für Gephyrin beschrieben, wäre denkbar. Angesichts der Instabi-

lität von Substrat (MPT) und Produkt (Moco) der Cnx1-katalysierten Reaktion könnte es auch zu einer Interaktion mit der MPT-Synthase (1.4.2) bzw. ABA3 (1.4.4) oder einem noch nicht identifizierten Moco-Carrierprotein (Moco-CP; bisher nur von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt, Aguilar *et al.*, 1992, Witte *et al.*, 1998) kommen. Eine spekulative Hypothese postuliert eine mögliche Kopplung der Mo-Insertion im dritten Schritt der Moco-Biosynthese mit der bei Eukaryoten noch ungeklärten zellulären Molybdat-Aufnahme (Schwarz *et al.*, 2000). Dabei könnte in Analogie zur Interaktion zwischen Gephyrin und dem GlyR eine Wechselwirkung von Cnx1 mit einem entsprechenden Anionen-Transporter (Molybdat-Carrier) vorliegen. In Anlehnung an die Rolle von Gephyrin in humanen Zellen veranschaulicht **Abb. 1.3** die mögliche Lokalisierung des pflanzlichen Cnx1-Proteins und gibt einen Überblick über dessen postulierte Interaktionspartner.

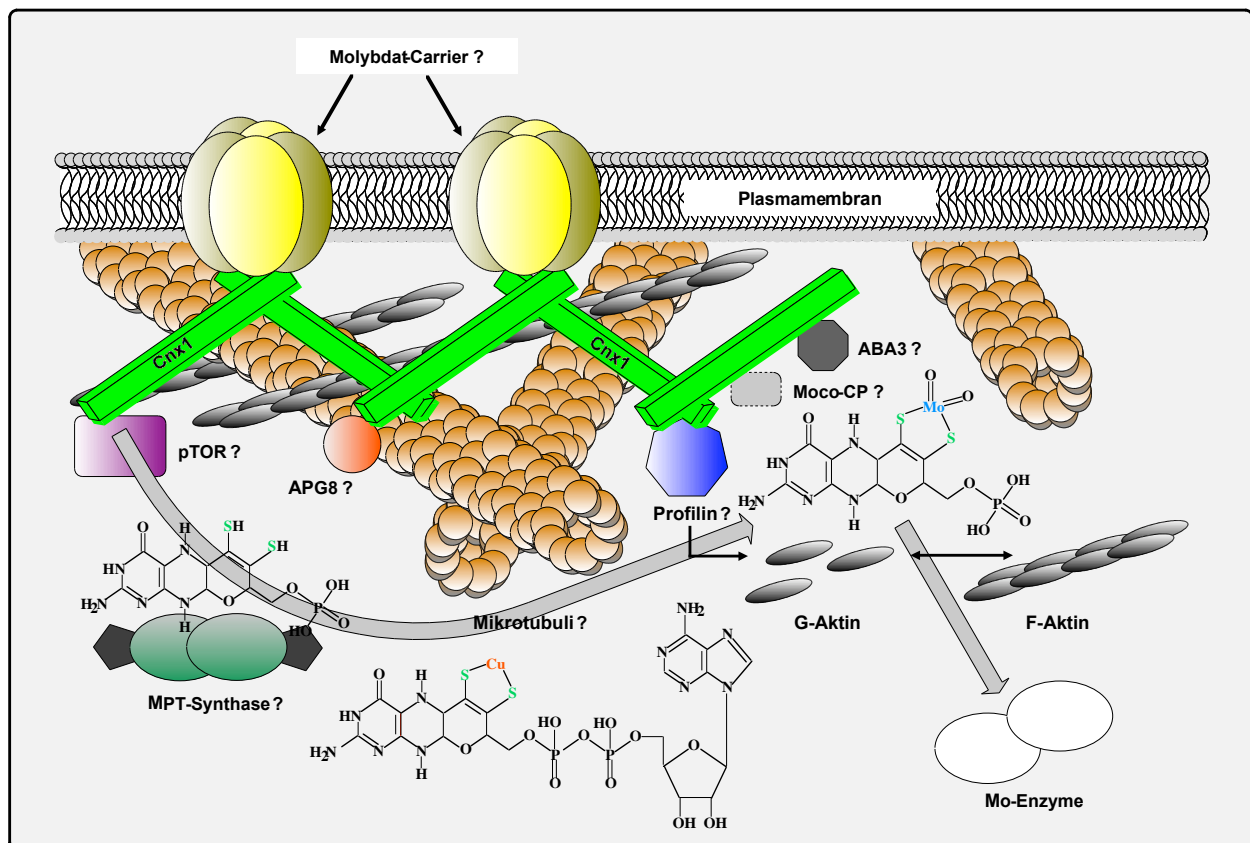


Abb. 1.3 Modell der Lokalisierung von Cnx1 in pflanzlichen Zellen. Gezeigt ist die mögliche Cnx1-Lokalisierung unterhalb der Plasmamembran in Verbindung mit hypothetischen Interaktionspartnern sowie Substrat (MPT), Intermediat (Cu-MPT-AMP) und Produkt (Moco) der Cnx1-katalysierten Mo-Insertions-Reaktion.

2. Ergebnisse

2.1 Gezielte Untersuchung potentieller Interaktionspartner des Cnx1-Proteins

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der zielgerichteten Untersuchung von Proteinen hinsichtlich einer möglichen Wechselwirkung mit der Molybdän-Insertase Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dabei wurden die potentiellen Interaktionspartner sowohl aufgrund von Homologien zu bereits identifizierten Gephyrin-bindenden Proteinen als auch basierend auf ihrer Beteiligung an angrenzenden Schritten der Molybdäncofaktor-Biosynthese ausgewählt. Besonderes Augenmerk galt dabei den Profilinen sowie den zum humanen GABARAP homologen APG8-Proteinen.

Zur biochemischen Detektion möglicher Wechselwirkungen bzw. deren *in vivo*-Nachweis durch GAL4 *Two Hybrid* wurden zunächst verschiedene Cnx1-Konstrukte für eine rekombinante Expression in *E. coli* und Hefe sowie zur *in vitro*-Transkription/Translation erstellt (zusammengefasst in **Tab. 2.1**). Alle Konstrukte wurden nach erfolgter Klonierung durch DNA-Sequenzierung auf Fehlerfreiheit überprüft.

2.1.1 Erzeugung von Cnx1-Expressionskonstrukten

Für die Interaktionsstudien mit putativen Liganden wurden sowohl Cnx1 als auch seine separaten Domänen (E und G) benötigt. Darüber hinaus lässt sich die E-Domäne in Analogie zur MoeA-Struktur (Xiang *et al.*, 2001) in vier Subdomänen unterteilen. Zur detaillierten Eingrenzung möglicher Bindungsstellen innerhalb der Cnx1 E-Domäne wurden daher auch Konstrukte erstellt, die die Subdomänen 1 und 2 bzw. 3 und 4 mit der G-Domäne fusionierten (**Abb. 2.1**).

2.1.1.1 Erzeugung von Cnx1-Konstrukten zur rekombinanten Expression in *E. coli*

Die Konstrukte Cnx1, Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ und Cnx1E in pQE60 (Expression als C-terminale *His-Tag* Fusion) lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Schwarz *et al.*, 1997). Um das Cnx1-Protein auch mittels eines *Intein-Tags* aus *E. coli* aufzureinigen zu können, wurde dessen codierende Sequenz in die *multiple cloning site* (MCS) des pTYB2-Vektors eingebracht. Zu diesem Zweck erfolgte eine PCR-Amplifikation der Cnx1-cDNA mit mutagenisierenden Primern, die am 5'-Ende eine *NdeI*- und am 3'-Ende eine *KpnI*-Schnittstelle generierten. Dabei beinhaltet die *NdeI*-Schnittstelle zugleich das Startcodon der Translation. Die Primer wurden so gewählt, dass Cnx1

in frame mit dem C-terminalen *Tag* aus *Intein* und Chitinbindungsdomäne (CBD) exprimiert wird. Auf diese Weise liegt das Protein nach Thiol-induzierter Spaltung ohne Anhang weiterer Aminosäuren vor.

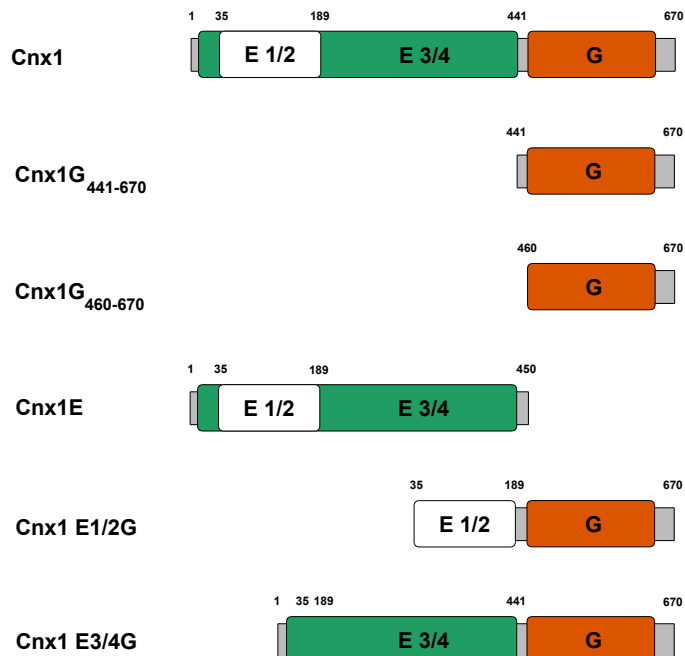


Abb. 2.1 Übersicht der erzeugten Cnx1-Varianten. Dargestellt sind die Bereiche der E-Domäne (grün), der G-Domäne (rot) sowie der Subdomänen 1/2 bzw. 3/4 unter Angabe der Aminosäure-Positionen (1-670) in Bezug auf *holo*-Cnx1.

2.1.1.2 Erzeugung von Cnx1-Konstrukten zur *in vitro*-Transkription/Translation

Zur *in vitro*-Transkription/Translation wurden sämtliche in **Abb. 2.1** aufgeführten Cnx1-Konstrukte in den pcDNA3-Vektor kloniert. Mit Ausnahme von Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ (*KpnI/KpnI*) wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/EcoRI* durch PCR-Amplifikation beiderseits der codierenden Sequenzen eingefügt. Da es sich hierbei um eine ungerichtete Klonierung handelte, wurde die korrekte Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse verifiziert. Für die Subdomänen-Konstrukte E1/2G und E3/4G wurde die Methode der Fusions-PCR angewendet.

2.1.1.3 Erzeugung von Cnx1-Konstrukten für GAL4 *Two Hybrid Assays*

Im Hinblick auf GAL4 *Two Hybrid*-Experimente konnte auf die Arbeiten von Lindecke (1999) zurückgegriffen werden. Damals war bereits die Cnx1-cDNA in den pGBKT7-Vektor kloniert und als *Bait*-Konstrukt zum *Screening* einer *A. thaliana* cDNA-Bank verwendet worden. Für detailliertere Untersuchungen wurden nun in analoger Weise auch die Konstrukte Cnx1E und Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ in pGBKT7 erzeugt. Zu diesem Zweck wurden an den 5'-Enden der codierenden Sequenzen *EcoRI*- und an den 3'-Enden *PstI*-Schnittstellen in der Weise generiert, dass die Cnx1-Domänen *in frame* mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne exprimiert werden.

Tab. 2.1 Zusammenfassung der in den jeweiligen Vektoren verfügbaren Cnx1-Konstrukte.

	Cnx1	Cnx1G ₄₄₁₋₆₇₀	Cnx1G ₄₆₀₋₆₇₀	Cnx1E	Cnx1 E1/2G	Cnx1 E3/4G
pQE60	<i>NcoI/BglII</i>	<i>NcoI/BglII</i>	/	<i>NcoI/BglII</i>	/	/
pTYB2	<i>NdeI/KpnI</i>	/	/	/	/	/
pcDNA3	<i>KpnI/KpnI</i>	<i>EcoRI/EcoRI</i>	<i>KpnI/KpnI</i>	<i>KpnI/KpnI</i>	<i>KpnI/KpnI</i>	<i>KpnI/KpnI</i>
pGBKT7	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	/	<i>EcoRI/PstI</i>	/	/

Angegeben sind die zur Klonierung der verschiedenen Vektor-/Konstruktkombinationen generierten Restriktionsschnittstellen.

2.1.2 Aufreinigung von rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten aus *E. coli*

Die *His-Tag* Fusionskonstrukte Cnx1, Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ und Cnx1E (pQE60) wurden entsprechend Schwarz *et al.* (1997) zur Expression und Aufreinigung aus *E. coli* eingesetzt. Dagegen mussten geeignete Bedingungen zur Gewinnung der *Intein*-Fusion von Cnx1 (pTYB2) zunächst ermittelt werden. Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) verwendet, der neben der für pTYB-Vektoren notwendigen T7-RNA-Polymerase auch über das pRARE-Plasmid verfügt. Dieses Plasmid codiert für sieben tRNA's, die im bakteriellen System nur schwach repräsentiert sind, aber bei eukaryotischen Proteinen häufiger auftreten können. Es handelt sich dabei um die Codons AGA, AGG und CGG (Arginin), AUA (Isoleucin), CUA (Leucin), CCC (Prolin) und GGA (Glycin). Da diese Tripletts an insgesamt 71 Positionen in der Cnx1-cDNA vorkommen, sollte die Anwesenheit von pRARE die Zahl von Translationsabbrüchen herabsetzen und dadurch die Ausbeute an rekombinantem Protein erhöhen.

Zur Bestimmung geeigneter Parameter wurden zunächst Expressionskinetiken im kleinen Massstab (50 ml Kulturen) durchgeführt, wobei alle 3 h ein Aliquot von 1 ml entnommen und das resultierende Zellpellet zur SDS-PAGE Analyse eingesetzt wurde. Folgende Bedingungen ergaben dabei die beste Ausbeute an rekombinantem Cnx1: Aus einer ÜN-Vorkultur wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert, bevor die Induktion mit 200 µM IPTG erfolgte. Anschliessend wurde für weitere 23 h bei 30°C inkubiert und daraufhin Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die Chitin-Matrix vorgenommen (**Abb. 2.2**). Pro Liter Expressionskultur wurden 10 ml Chitinmatrix verwendet. Je nach Verwendungszweck wurde Cnx1 durch Zugabe von 1,5 SV *Cleavage*-Puffer eluiert und auf eine Konzentration von 20 µM ankonzentriert oder (für *Pull Down*-Experimente) als *Intein*-Fusion an der Matrix belassen.

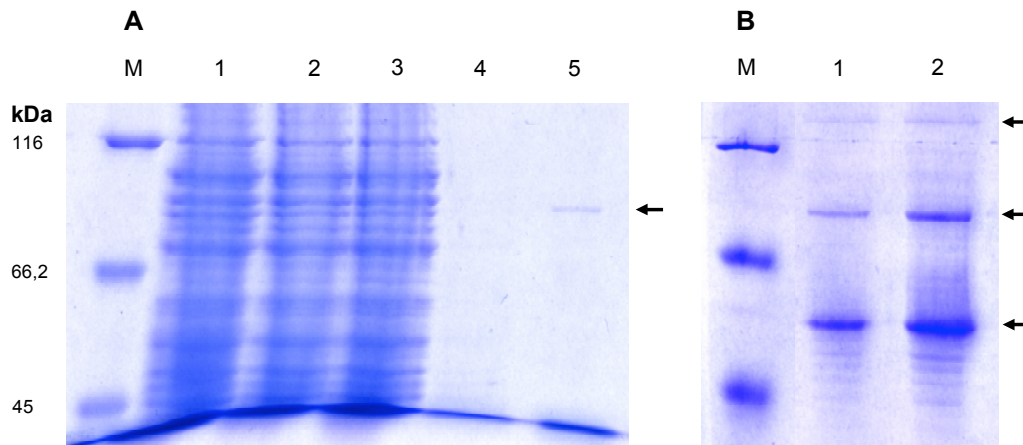


Abb. 2.2 Aufreinigung von Cnx1-Intein. (A) zeigt die einzelnen Reinigungsschritte (5 l Kultur; Ausbeute 7,2 mg rekombinantes Cnx1) mit Rohextrakt (1), Durchbruch nach Beladung der Matrix (2), Fraktion nach 2 SV Waschen (3), Fraktion nach 20 SV Waschen (4), Elution (5). Es wurden jeweils 20 µl Aliquots aufgetragen. (B) zeigt 10 µl (1) und 20 µl (2) in 25 µl 1x Lp aufgenommene Chitin-Matrix vor der Elution. Die Pfeile zeigen (von oben nach unten) die Cnx1-Intein-Fusion, Cnx1 und freies Intein. Es wurden 7,5 % SDS-PA-Gele verwendet und diese Coomassie-gefärbt.

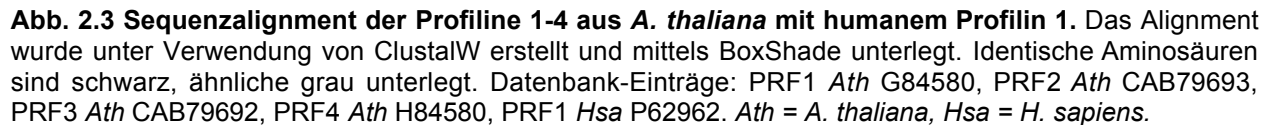
2.1.3 Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: *A. thaliana* Profiline

Profiline sind kleine Proteine von 12-15 kDa Masse, die an der Regulation der Aktinpolymerisierung beteiligt sind (Calsson *et al.*, 1976). Humanes Profilin I wird ubiquitär exprimiert, während die Isoform IIa nur in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden konnte (Honore *et al.*, 1993). Profiline binden in Form eines 1:1-Komplexes an G-Aktin, das Signalmolekül Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und verschiedene Prolin-reiche Proteine (Schlüter *et al.*, 1997).

Im pflanzlichen System wurden Profiline ursprünglich als Allergene aus Birkenpollen beschrieben (Valenta *et al.*, 1991). Huang *et al.* (1996) publizierten die Entdeckung einer Profilin-Genfamilie bei *A. thaliana* und gingen nach DNA-Sequenzvergleichen davon aus, dass diese mindestens 8-10 Mitglieder umfasst. Angesichts der bekannten Interaktion von Profilin und Gephyrin bei Säugern waren die pflanzlichen Profiline als potentielle Cnx1-Interaktionspartner in Betracht zu ziehen.

2.1.3.1 Klonierung von PRF1 und PRF2 zur rekombinanten Expression in *E. coli*

In **Abb. 2.3** ist ein Sequenzalignment der Profiline 1-4 aus *A. thaliana* mit humanem Profilin 1 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die pflanzlichen Profiline untereinander in ihrer AS-Sequenz hochgradig homolog sind, während die Übereinstimmung zum humanen Profilin wesentlich geringer ausfällt.



Zur Untersuchung auf mögliche Wechselwirkung mit Cnx1 sollten die cDNA's der Profiline 1 und 2, die laut Huang *et al.* (1996) und Christensen *et al.* (1996) übereinstimmend konstitutiv exprimiert werden, in Expressionsplasmide kloniert werden. Als Zielvektor wurde pQE60 (Expression als C-terminale *His-Tag* Fusion) ausgewählt. Es wurden Primer generiert, die Restriktionsschnittstellen für *NcoI* und *BglII* am 5'- bzw. 3'-Ende der codierenden Sequenzen erzeugten. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit einer *A. thaliana* cDNA-Bank (pGAD10) als Template. Nach Abschluss der Klonierung war jedoch für keines der Konstrukte eine Expression in *E. coli* nachweisbar. Eine Sequenzierung des Promotors ergab sowohl für pQE60-PRF1 als auch pQE60-PRF2 eine Deletion von 32 bp im Bereich des *lac*-Operators, die auch den Transkriptionsstart des Vektors beseitigte. Zur Lösung dieses Problems wurden beide Konstrukte mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und die auf diese Weise erhaltenen Fragmente, bestehend aus Ribosomenbindungsstelle, cDNA und C-terminalem *His-Tag*, in den pQE80-Vektor umkloniert. Da pQE80 selbst den *lac*-Repressor codiert, ist kein separates Repressorplasmid (pREP4) erforderlich. Darüber hinaus sinkt die Wahrscheinlichkeit von Mutationen, da die Konstrukte nach Ligation und Transformation sofort reprimiert werden und sich daher für das Wirtsbakterium weniger problematisch gestalten.

Für weitergehende Experimente wurden die cDNA's von PRF1 und PRF2 in pGADT7 umkloniert. Dabei handelt es sich um einen Vektor, der zum einen im Rahmen von GAL4 *Two Hybrid Assays* in Hefezellen eine *Prey*-Fusion aus Transkriptions-Aktivierungsdomäne und Zielprotein exprimiert. Zum anderen erlaubt dieses Plasmid aber auch den Einsatz zur *in vitro*-Transkription/Translation, da es über den hierzu notwendigen T7-Promotor verfügt. Die codie-

renden Sequenzen von PRF1 und PRF2 wurden über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* in die MCS von pGADT7 inseriert.

2.1.3.3 Expression und Aufreinigung von PRF1 und PRF2

Zur Gewinnung der *His-Tag* Fusionen von PRF1 und PRF2 wurden zunächst mittels Expressionskinetiken geeignete Parameter ermittelt. Folgende Bedingungen erwiesen sich für PRF1 als optimal: Von einer ÜN-Vorkultur (*E. coli* Rosetta [DE3]) wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 22°C inkubiert, bis die Induktion mit 20 µM IPTG erfolgte. Nach weiteren 13 h Inkubation bei 22°C wurden Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die NiNTA-Matrix vorgenommen (**Abb. 2.4 A**).

Für PRF2 *His-Tag* konnten keine Parameter gefunden werden, die zu einer messbaren Expression des Fusionsproteins in löslicher Form führten. Es wurde daher eine denaturierende Aufreinigung der entstehenden *inclusion bodies* vorgenommen. Eine Denaturierung der unlöslichen Proteinfraction wird dabei über Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid zum Lysis- sowie 6 M Harnstoff zu Wasch- und Elutionspuffer erreicht. Von einer ÜN-Vorkultur (*E. coli* BL21 [DE3]) wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C inkubiert, bis die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Nach weiteren 25 h Inkubation bei 37°C wurden Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die NiNTA-Matrix vorgenommen. Nach Elution von der NiNTA-Matrix wurde durch Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse ein Übergang des Proteins in den löslichen Zustand erreicht (**Abb. 2.4 B**).

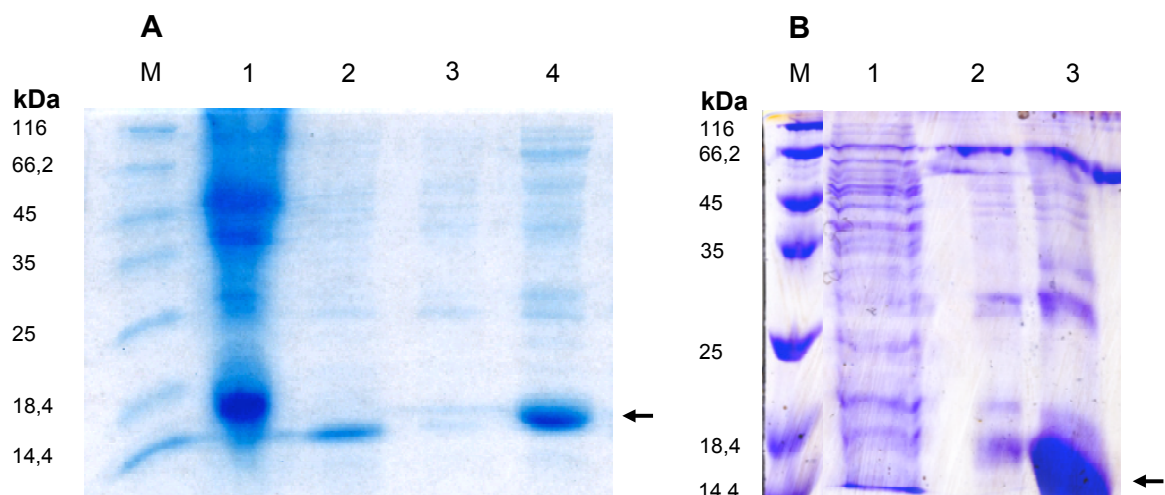


Abb. 2.4 Aufreinigung von PRF1 und PRF2 *His-Tag*. Gezeigt sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung von PRF1 (A; Ausbeute 5,2 mg) und PRF2 (B; Ausbeute 13,8 mg) aus 2 l Kultur. Auftrag (A): Rohextrakt (1), Fraktion nach 10 SV Waschen (2), Fraktion nach 20 SV Waschen (3), Elution (4). Auftrag (B): Rohextrakt (1; 1:6 verdünnt), Fraktion nach 10 SV Waschen (2), Elution (3). Die Pfeile zeigen die PRF1 bzw. PRF2 *His-Tag* Fusion (15,01 bzw. 14,80 kDa). Es wurden jeweils 20 µl Aliquots auf 17 % SDS-PA-Gele aufgetragen und diese Coomassie-gefärbt.

Nach Elution von der NiNTA-Matrix standen die rekombinant aufgereinigten Profiline in Konzentrationen von 57 μM (PRF1) bzw. 155 μM (PRF2) für weitere Experimente zur Verfügung.

2.1.3.4 Cnx1-Interaktionsstudien mit PRF1 und PRF2

Zum Nachweis möglicher Wechselwirkungen zwischen Cnx1 und PRF1 bzw. PRF2 wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt:

- (1) Gelfiltration zur Detektion eines möglichen Cnx1-Profilin-Komplexes
- (2) *Dot Overlay Assays* mit *in vitro*-translatierten Profilinen bzw. Cnx1-Konstrukten
- (3) *GAL4 Two Hybrid*
- (4) ELISA-basierte Interaktionsstudien

(1) Es wurden jeweils 5 μmol PRF1 bzw. PRF2 mit einer äquimolaren Menge von rekombinantem Cnx1, Cnx1G oder Cnx1E (*His-Tag* Fusion) co-inkubiert und anschliessend durch Gelfiltration analysiert. Im Falle einer Interaktion sollte es zu einem dritten Absorptionsmaximum kommen, dessen Elutionsvolumen den Massen beider Einzelproteine entsprechen würde. Dies war jedoch bei keiner der sechs Kombinationen der Fall (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei der Gelfiltration allerdings um einen wenig sensitiven Ansatz handelt, mit dem nur die Ausbildung eines Komplexes bei starken Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen kann, ist eine mögliche Interaktion durch dieses Resultat noch nicht widerlegt.

(2) In einem weiteren Ansatz wurde die Technik des *Dot Overlay Assays* angewendet. Zu diesem Zweck wurde rekombinant exprimiertes PRF1 bzw. PRF2 in jeweils zwei verschiedenen Mengen (300 und 600 pmol) auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit *in vitro*-translatierten Cnx1-Varianten co-inkubiert (**Abb. 2.5**).

In der Autoradiographie dunkel erscheinende Punkte („dots“) signalisieren Wechselwirkung des markierten Translats mit dem immobilisierten Protein. Im vorliegenden Fall waren Signale zu erkennen, die in ihrer Intensität die der Negativkontrolle (BSA) übertrafen. Unterschiedlich starke Bindung der einzelnen Cnx1-Konstrukte ging aber offenbar auf verschieden starke Wechselwirkung mit der Membran zurück, was an der jeweiligen Hintergrundfärbung zu erkennen war (die stärksten Signale erzeugten die Deletionskonstrukte E1/2G bzw. E3/4G). Darüber hinaus war eine Unterscheidung hinsichtlich PRF1/PRF2 bzw. eine Konzentrationsabhängigkeit nicht festzustellen, so dass insgesamt von unspezifischen Wechselwirkungen ausgegangen werden musste.

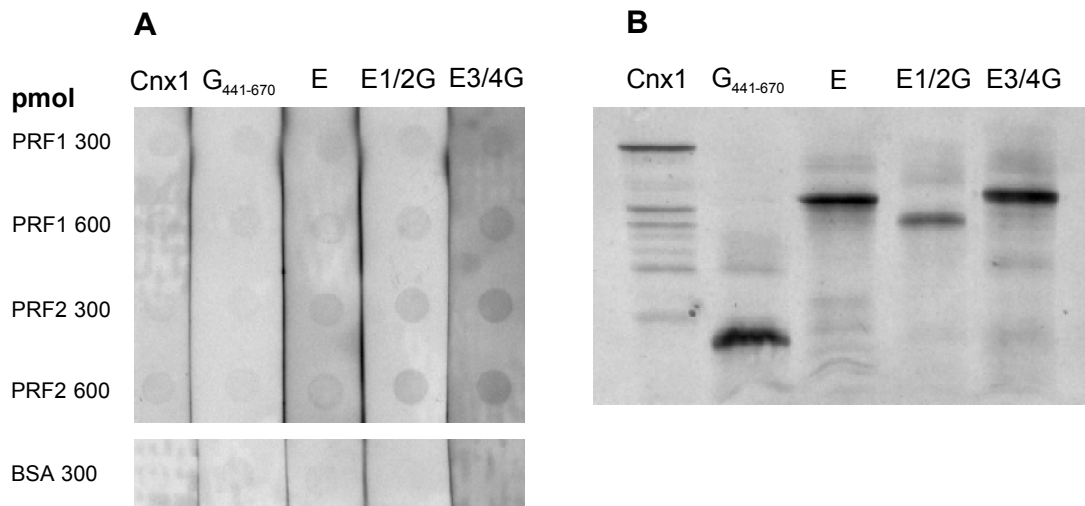


Abb. 2.5 Dot Overlay Assays von Profilinen mit *in vitro*-translatierten Cnx1-Varianten. (A) zeigt die co-inkubierten Membranabschnitte unter Angabe der Menge an immobilisiertem Protein (links) und jeweiligem Cnx1-Konstrukt (oben). In (B) ist das Kontrollgel der Translation dargestellt (10 % SDS-PA-Gel, Auftrag jeweils 1,5 μ l eines 25 μ l Translationsansatzes).

Für einen zweiten *Dot Overlay*-Ansatz wurden die Konstrukte PRF1/PRF2 in pGADT7 zur *in vitro*-Translation verwendet und rekombinantes Cnx1, Cnx1G und Cnx1E (jeweils *His-Tag* Fusion) immobilisiert. Dabei ergab sich, dass für PRF2 keine Translation festgestellt werden konnte, obwohl das Konstrukt durch DNA-Sequenzierung überprüft worden war. Bleibt eine Translation dennoch aus, kann dies z. B. durch Ausbildung von Sekundärstrukturen der mRNA begründet sein, die mit der Translationsmaschinerie interferieren. Im Fall von PRF1 konnte erneut keine Interaktion mit Cnx1 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

(3) Zur Detektion möglicher Wechselwirkungen zwischen Cnx1 und Profilinen *in vivo* wurden GAL4 *Two Hybrid Assays* unternommen. Dabei sollten Cnx1, Cnx1G und Cnx1E (pGBKT7) als *Bait* und PRF1 und PRF2 (pGADT7) als *Prey* dienen. Es wurden alle fünf Konstrukte zunächst jeweils mit dem leeren Gegenvektor in den Hefestamm AH109 transformiert und auf SD Leu⁻Trp⁻His⁻X- α -Gal⁺ ausgebracht, um sicherzustellen, dass keine Selbstaktivierung der Reportergene vorliegt. Dabei stellte sich heraus, dass mit Cnx1G-pGBKT7/pGADT7 transformierte Hefen sowohl Wachstum zeigten als auch eine Blaufärbung erzeugten. Das bedeutet, dass die Fusion aus Cnx1G-GAL4-Bindedomäne in Gegenwart der GAL4-Aktivierungsdomäne die Reportergene *his3* und *mel1*, die schwache Wechselwirkung signalisieren, auch in Abwesenheit eines Interaktionspartners aktiviert. Wurde die gleiche Kombination (Cnx1G-pGBKT7/pGADT7) auf SD Leu⁻Trp⁻His⁻Ade⁻X- α -Gal⁺ ausplattiert, trat kein Wachstum auf. Als Resultat dieser Vorversuche konnte Cnx1G im GAL4 *Two Hybrid* nur zur Detektion starker Wechselwirkungen herangezogen werden, die ein Wachstum auf Ade⁻-Medium vermitteln. Alle anderen Konstrukte zeigten dagegen keine Selbstaktivierung. Dementsprechend wurden beide Profiline zunächst

gegen Cnx1 und Cnx1E getestet, ein Wachstum der Hefen blieb aber bereits bei geringem Selektionsdruck (His^-) aus. Eine ohnehin unwahrscheinliche Interaktion mit der Cnx1 G-Domäne (humanes Profilin bindet an die Gephyrin E-Domäne, Giesemann *et al.*, 2003) konnte aufgrund der beschriebenen Selbstaktivierung nur eingeschränkt getestet werden, diese Ansätze fielen ebenfalls negativ aus.

(4) Rekombinant aufgereinigtes PRF1/PRF2 sowie Cnx1 (*His-Tag*) wurden für *in vitro*-Interaktionstests mittels ELISA verwendet. Hierfür wurden jeweils 50 pmol Profilin pro *well* immobilisiert und mit 5-250 pmol Cnx1 überschichtet. Gebundenes Cnx1 wurde durch einen monoklonalen, gegen die E-Domäne gerichteten Primär-Antikörper (6B9, 1:900) nachgewiesen, wobei die durch den Sekundär-Antikörper vermittelte Farbreaktion jeweils um den Wert einer Negativkontrolle (BSA überschichtet mit Cnx1) bereinigt wurde.

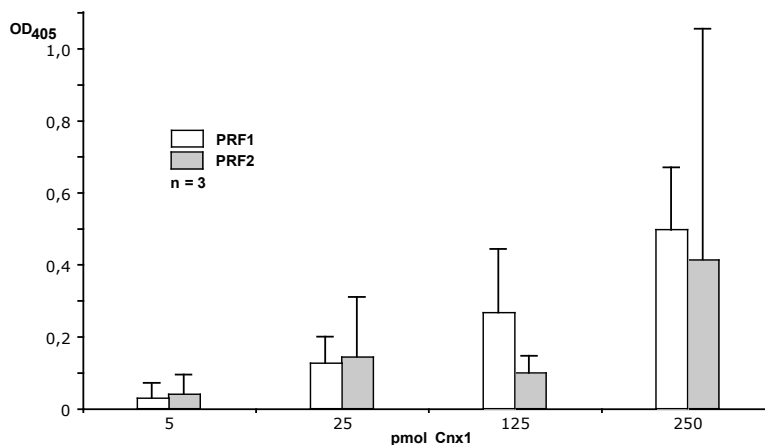


Abb. 2.6 ELISA von immobilisierten Profilinen und Cnx1. Gezeigt sind die für PRF1 (weiss) und PRF2 (grau) gemessenen Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Menge an überschichtetem Cnx1. Beide Messreihen wurden dreifach durchgeführt. Das jeweils gemittelte Ergebnis ist unter Angabe der Standardabweichung dargestellt.

Wie **Abb. 2.6** zu entnehmen ist, ergab sich im Fall von PRF1 ein dosisabhängiger Anstieg der Absorption bei Erhöhung der Menge an co-inkubiertem Cnx1. Eine solche Korrelation könnte auf eine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen hindeuten. Für PRF2 waren starke Schwankungen ohne signifikante Erhöhung der Absorptionswerte zu beobachten, so dass aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit hier Schlussfolgerungen fraglich sind.

2.1.4 Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: *A. thaliana* APG8-Proteine

Das GABA-Rezeptor assoziierte Protein GABARAP ist neben MAP1-LC3, GATE-16 und APG8L eines der humanen Homologen des APG8-Proteins aus Hefe. Es interagiert sowohl mit der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA-Rezeptors als auch mit Gephyrin, bildet aber offenbar keine Verbindung zwischen beiden Proteinen (Kneussel *et al.*, 2000). GABARAP besitzt ein Tubulin-Bindungsmotiv (AS 1-36) und verfügt wie alle APG8-Homologen über einen konservierten Gly-

Da im humanen System mit GABARAP nur eines von vier APG8-Homologen an Gephyrin bindet, musste davon ausgegangen werden, dass im Falle einer möglichen APG8-Cnx1-Interaktion in Pflanzen nicht alle neun Mitglieder der Proteinfamilie eine solche Wechselwirkung zeigen. Für eine Vorauswahl erwies sich die Auswertung eines bereits mit einem Cnx1-*Bait* durchgeführten GAL4 *Two Hybrid Screens* (Lindecke, 1999) als hilfreich. Anhand von nachträglichen DNA-Sequenzanalysen im Rahmen dieser Arbeit konnte einer der damals identifizierten Klone (ursprünglich angegeben als „putatives Symbiosis-Protein“) als APG8i identifiziert werden. Obwohl mittels *Two Hybrid* keine Verifizierung einer Cnx1-Interaktion gelang, wurde das Auftreten von APG8i als möglicher Hinweis auf eine solche Wechselwirkung bewertet. Auf der Basis der oben beschriebenen Gruppierung der pflanzlichen APG8-Proteine sollten daher zunächst die codierenden Sequenzen von APG8h und APG8i in bakterielle Expressionsvektoren kloniert werden. Als Zielvektor wurde pQE30Xa ausgewählt, der eine Expression der cDNA als N-terminale *His-Tag* Fusion vermittelt. Es wurden Primer generiert, die Restriktionsschnittstellen für *StuI* und *KpnI* am 5'- bzw. 3'-Ende der codierenden Sequenzen erzeugten. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit einer *A. thaliana* cDNA-Bank (pGAD10) als Template. Erstaunlicherweise konnte für beide APG8-Varianten nach erfolgter Klonierung die bereits bei der Erzeugung der pQE60-Profilin-Konstrukte (vergl. 2.1.3.1) festgestellte Promotor-Deletion nachgewiesen werden, die eine Expression der cDNA verhindert. Offenbar handelt es sich hier also um eine wiederholt auftretende Manipulation der Plasmid-DNA durch *E. coli*, die möglicherweise dadurch begünstigt wird, dass die rekombinant exprimierenden Proteine mit dem bakteriellen Stoffwechsel interferieren. Das APG8h/APG8i-Expressionsproblem wurde entsprechend 2.1.3.1 durch eine *EcoRI/HindIII*-Umklonierung in pQE80 gelöst.

2.1.4.2 Klonierung von APG8-Proteinen für GAL4 *Two Hybrid Assays* und *in vitro*-Transkription/Translation

Neben der rekombinanten Expression und Aufreinigung von APG8h/APG8i sollten in einem umfassenderen Ansatz alle neun APG8-Proteine mittels GAL4 *Two Hybrid* und *in vitro*-Transkription/Translation auf Interaktion mit Cnx1 überprüft werden. Dazu wurden die jeweiligen cDNA's aus einer pGAD10-cDNA-Bank amplifiziert und über eingeführte *NcoI/XmaI*-Restriktionsschnittstellen in den pGADT7-Vektor kloniert (vergl. 2.1.3.2).

Einzig für GAL4 *Two Hybrid* wurden von jedem Konstrukt zwei zusätzliche Reklonierungen (ebenfalls pGADT7, *NcoI/XmaI*) vorgenommen. Vom humanen Homologen GABARAP ist bekannt, dass es über ein Tubulin-Bindungsmotiv im Bereich der AS 1-36 verfügt, welches aber nicht für die Gephyrin-Interaktion erforderlich ist (Kneussel *et al.*, 2000). Da eine mögliche Tubulin-Bindung der pflanzlichen APG8-Proteine einen Transport in den Hefe-Zellkern und somit

Reportergen-Aktivierung im GAL4 *Two Hybrid* ausschliessen könnte, wurden N-terminale Deletionskonstrukte generiert, indem jeweils an der zur AS-Position 36 von GABARAP homologen Position ein neues Startcodon eingeführt wurde (**Abb. 2.7**). Diese Konstrukte wurden APG8 $\Delta 36$ genannt.

Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit GAL4 *Two Hybrid* könnte die APG8-PE-Konjugation darstellen, weil die resultierende Membranverankerung der Proteine ebenfalls eine Kernlokalisierung verhindern würde. Da pflanzliche APG8-Proteine den Ausfall ihrer Hefe-Homologen komplementieren können (Ketelaar *et al.*, 2004), ist davon auszugehen, dass es auch in diesem Fall der heterologen Expression zu einer Lipid-Verknüpfung kommt. Um einen solchen Prozess zu verhindern, wurden die APG8 $\Delta 36$ -Konstrukte durch PCR-Mutagenese so verändert, dass sie anstelle des zur PE-Konjugation erforderlichen konservierten Glycin-Restes am C-Terminus einen Valin-Rest tragen, der eine Lipid-Verknüpfung sterisch verhindert. Diese Konstrukte wurden APG8 $\Delta 36$ GV genannt. **Abb. 2.8** zeigt die Zusammenfassung der erzeugten APG8-Konstrukte.

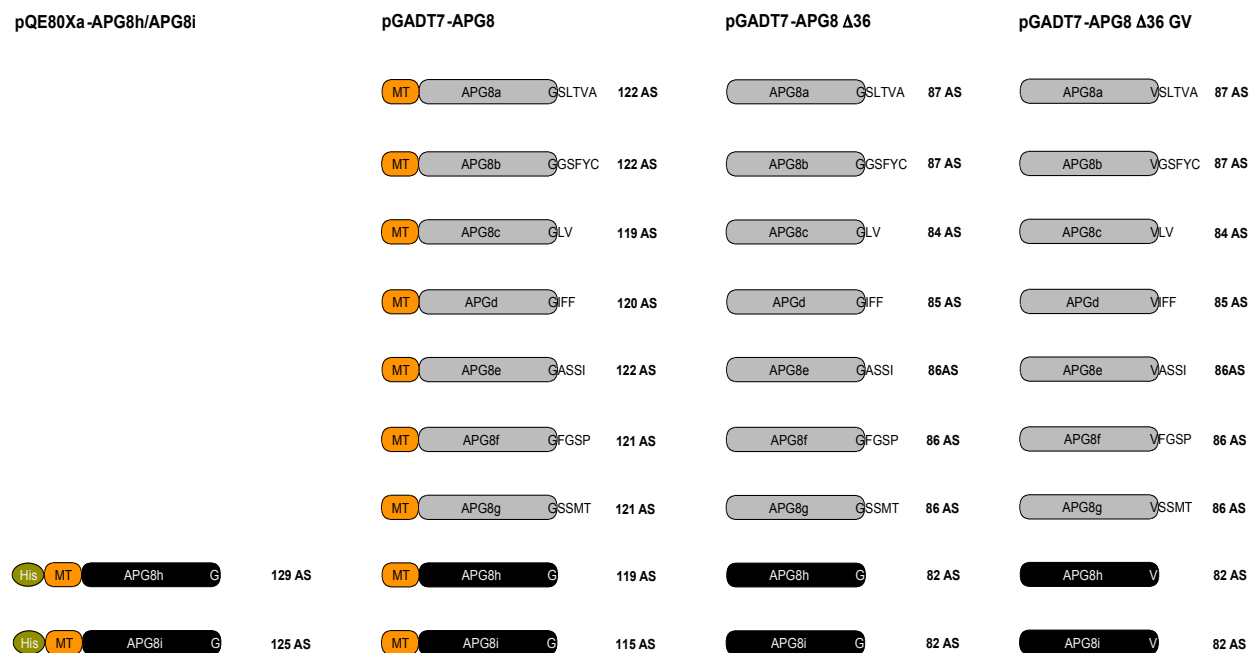


Abb. 2.8 Übersicht der verschiedenen APG8-Konstrukte. Dargestellt sind die Domänenstruktur (His = *His-Tag*; MT = Bindedomäne für Mikrotubuli), die C-terminale Aminosäure-Sequenz, beginnend mit dem konservierten Glycin-Rest, sowie die Grösse jedes Proteins (Anzahl der Aminosäuren).

2.1.4.3 Expression und Aufreinigung von APG8h und APG8i

Zur Aufreinigung von APG8h und APG8i (*His-Tag* Fusionen) wurden zunächst mittels Expressionskinetiken geeignete Parameter ermittelt. Folgende Bedingungen erwiesen sich für APG8h

als optimal: Von einer ÜN-Vorkultur (*E. coli* Rosetta [DE3]) wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C inkubiert, bis die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Nach weiteren 7 h Inkubation bei 37°C wurden Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die NiNTA-Matrix vorgenommen (**Abb. 2.9 A**). Im Falle von APG8i wurde ebenfalls *E. coli* Rosetta (DE3) als Expressionsstamm verwendet, jedoch die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:65 angeimpft und bei 22°C bis zu einer OD_{600} von 0,45 inkubiert. Nach Induktion mit 100 µM IPTG und Inkubation für 14 h bei 22°C erfolgten Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die NiNTA-Matrix (**Abb. 2.9 B**).

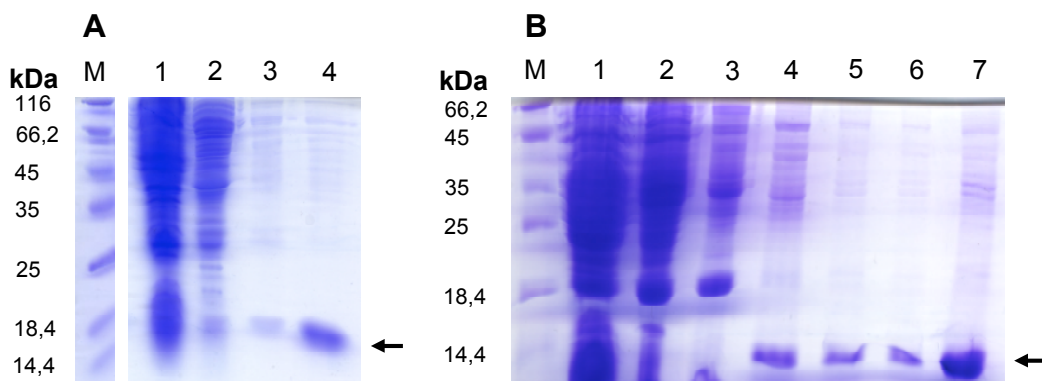


Abb. 2.9 Aufreinigung von APG8h und APG8i His-Tag. Gezeigt sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung von APG8h (A; Ausbeute 1,12 mg) und APG8i (B; Ausbeute 3,0 mg) aus 1,5 bzw. 3 l Kultur. Auftrag (A): Rohextrakt (1), Fraktion nach 5 SV Waschen (2), Fraktion nach 15 SV Waschen (3), Elution (4). Auftrag (B): Rohextrakt (1), Durchbruch (2), Fraktionen nach 5, 10, 15, 20 SV Waschen (3-6), Elution (7). Die Pfeile zeigen die APG8h bzw. APG8i His-Tag Fusion (14,71 bzw. 13,94 kDa). Es wurden jeweils 20 µl Aliquots auf 17 % SDS-PA-Gele aufgetragen und diese Coomassie-gefärbt.

Nach Elution von der NiNTA-Matrix wurden die rekombinant aufgereinigten APG8-Proteine auf Konzentrationen von 51 µM (APG8h) bzw. 43 µM (APG8i) ankonzentriert.

2.1.4.4 Cnx1-Interaktionsstudien mit APG8-Proteinen

Zum Nachweis möglicher Wechselwirkungen zwischen Cnx1 und den APG8-Proteinen wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt:

- (1) Gelfiltration zur Detektion eines möglichen Cnx1-APG8-Komplexes
- (2) Dot Overlay Assays mit *in vitro*-translatierten APG8-Proteinen bzw. Cnx1-Varianten
- (3) Pull Down Assays mit *in vitro*-translatierten APG8-Proteinen
- (4) GAL4 Two Hybrid

(1) Zur Gelfiltration wurden jeweils 5 µmol APG8h bzw. APG8i mit einer äquimolaren Menge von rekombinantem Cnx1, Cnx1G oder Cnx1E (His-Tag Fusion) co-inkubiert und anschliessend

durch Auftrennung an einer Superdex 200-Säule untersucht (vergl. **2.1.3.4**). Wie schon bei den Cnx1-Profilin-Interaktionstests liess sich aber auch in diesem Fall kein Komplex von Cnx1 mit APG8h/8i nachweisen (Daten nicht gezeigt), was jedoch mögliche schwächere Wechselwirkungen nicht ausschliesst. Die übrigen sieben Mitglieder der *A. thaliana* APG8-Familie wurden nicht untersucht, da sie nicht rekombinant exprimiert und aufgereinigt vorlagen.

(2) Unter Verwendung des *Dot Overlay Assays* wurden in einem ersten Ansatz rekombinantes APG8h und APG8i (jeweils 600 pmol) auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit *in vitro*-translatierten Cnx1-Varianten co-inkubiert.

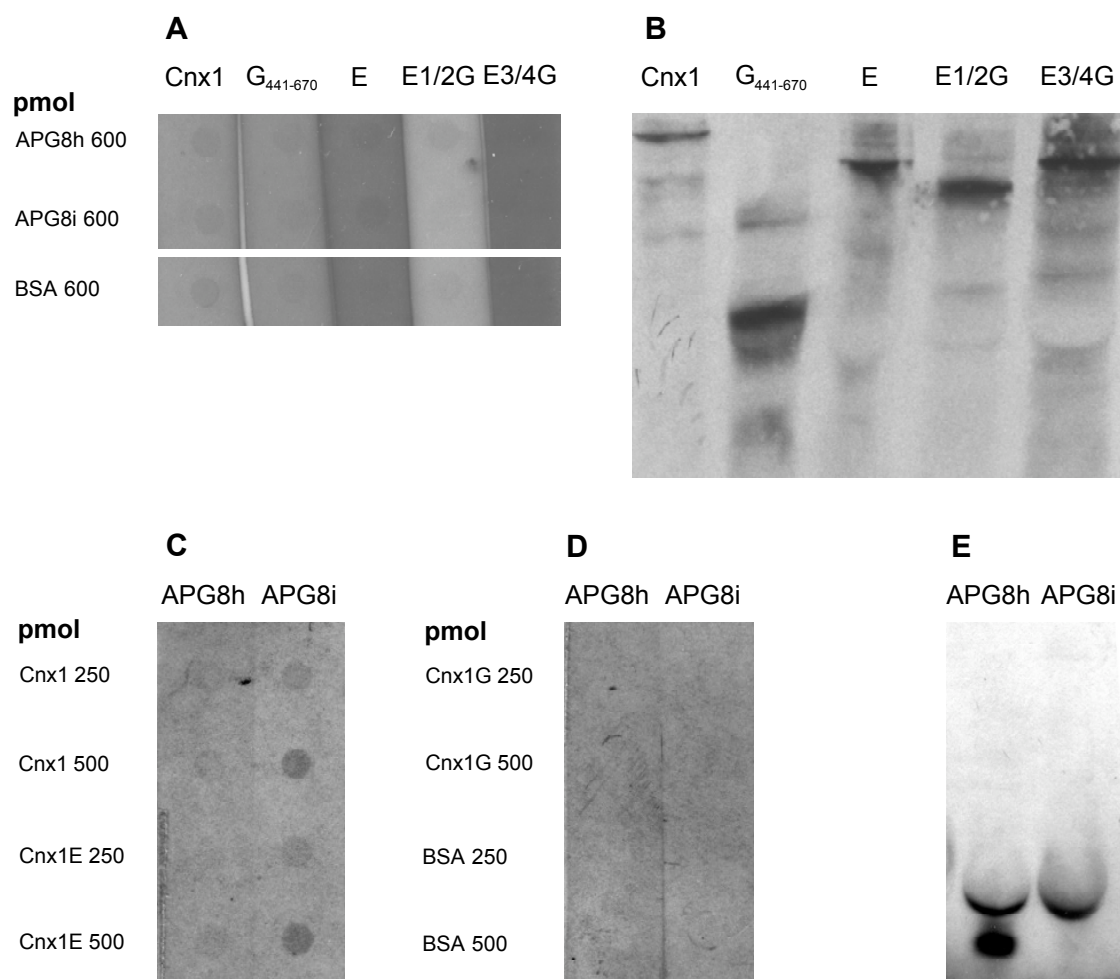


Abb. 2.10 Dot Overlay Assays von APG8h/APG8i und Cnx1-Varianten. (A) und (B) zeigen den *Overlay Assay* und das Kontrollgel auf der Basis von immobilisiertem APG8h/APG8i und co-inkubierten Cnx1-Varianten, (C)/(D) und (E) den *Overlay Assay* und das Kontrollgel nach Immobilisierung von Cnx1-Varianten und Co-Inkubation mit APG8h/APG8i. Dargestellt sind die co-inkubierten Membranabschnitte unter Angabe der Menge an immobilisiertem Protein (links) und co-inkubiertem *in vitro*-Translat (oben) sowie die Kontrollgele, auf die jeweils 1,5 µl eines 25 µl Translationsansatzes aufgetragen wurden. Für (B) wurde ein 10 % SDS-PA-Gel, für (E) ein 17 % SDS-PA-Gel verwendet.

Wie aus **Abb. 2.10 A/B** hervorgeht, entsprachen die für APG8h/APG8i erhaltenen Signale („dots“) in ihrer Intensität jeweils der parallelen Negativkontrolle (BSA). Neben der schon aus **2.1.3.4** bekannten unterschiedlich starken Bindung der einzelnen Cnx1-Konstrukte an die Membran (verschieden dunkle Streifen) konnten keine positiven *dots* zugeordnet werden. Auch war keine Unterscheidung zwischen APG8h und APG8i festzustellen, so dass das Ergebnis dieses *Overlay Assays* als negativ bewertet werden musste.

In der Umkehrung wurde auch ein *Overlay Assay* mit immobilisiertem Cnx1, Cnx1G und Cnx1E sowie *in vitro*-translatiertem APG8h/APG8i durchgeführt (**Abb. 2.10 C-E**). Aus dem Kontrollgel ist zu entnehmen, dass beide pGADT7-APG8-Konstrukte *in vitro* Protein erzeugten, wobei im Falle von APG8h eine zusätzliche kleinere Bande erschien, die möglicherweise auf die Nutzung eines internen Startcodons während der Translation zurückzuführen ist. Im *Overlay Assay* erzeugten sowohl APG8h als auch APG8i Signale mit Cnx1 und Cnx1E, nicht jedoch mit Cnx1G oder BSA als Negativkontrolle. Die Intensität der *dots* von APG8h/APG8i zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit von der immobilisierten Menge an Cnx1 bzw. Cnx1E und ist im Falle von APG8i generell stärker ausgeprägt. Somit ergaben sich aus diesem *Overlay Assay* erste Hinweise auf eine Interaktion von APG8h/APG8i mit Cnx1, wobei zu bedenken ist, dass dies im Ansatz auf Basis von rekombinantem APG8/*in vitro*-translatiertem Cnx1 (**Abb. 2.10 A/B**) nicht zutraf.

(3) In Ergänzung zu den vorhergehenden Versuchsansätzen wurden alle neun pGADT7-APG8-Konstrukte nach *in vitro*-Translation für *Pull Down*-Experimente mit rekombinantem Cnx1 eingesetzt. Dabei wurden je Ansatz 10 µl mit Cnx1-*Intein* saturierte Chitin-Matrix mit dem APG8-Translat co-inkubiert und nach 2-4 Waschschritten auf Verbleib des markierten Translats im Pellet und somit auf Interaktion mit Cnx1 untersucht.

Abb. 2.11 A ist zu entnehmen, dass sich in der Autoradiographie für alle APG8-Konstrukte Signale einer Translat-Bande ergaben. Bemerkenswert ist der im Vergleich zu APG8h/APG8i deutlich verzögerte Lauf der restlichen sieben APG8-Proteine in der SDS-PAGE, obwohl hier nur Abweichungen von wenigen AS vorliegen. Dieses Verhalten ist analog zur zweigeteilten Gruppierung der APG8-Proteine aufgrund des Vergleichs ihrer Primärstruktur (Doelling *et al.*, 2002).

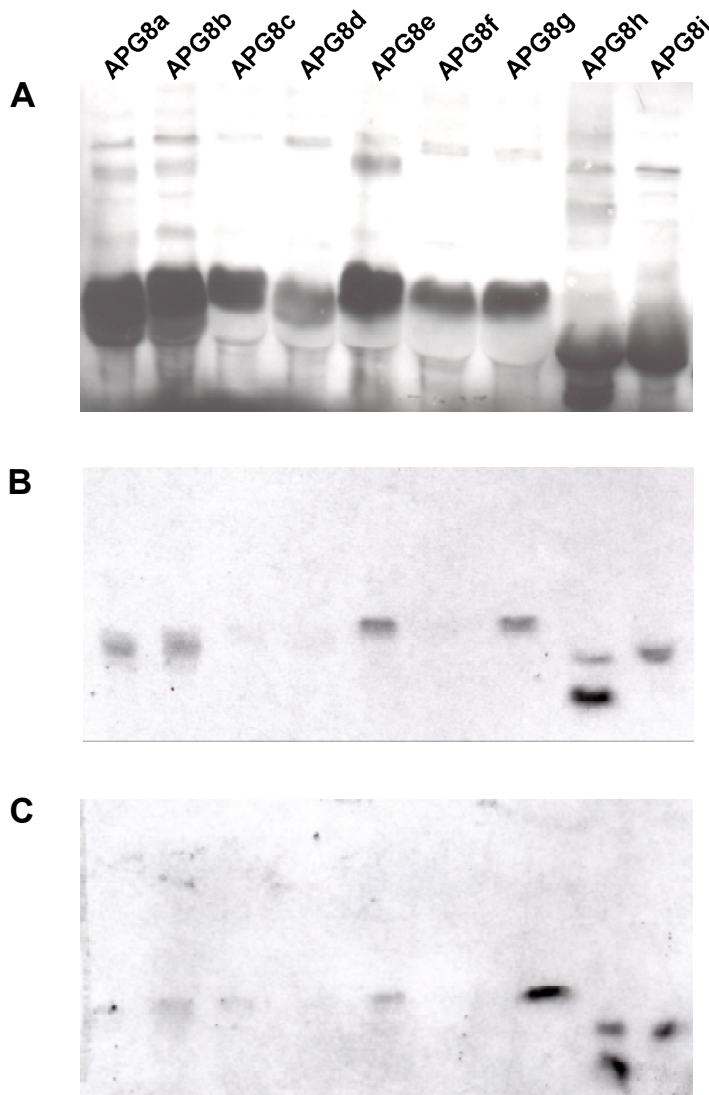


Abb. 2.11 Pull Down Assays von *in vitro*-translatierten APG8-Proteinen mit Cnx1-Intein. (A) zeigt das Kontrollgel der *in vitro*-Translation von APG8a-APG8i. Es wurden 2 μ l eines 25 μ l Translationsansatzes auf ein 17 % SDS-PA-Gel aufgetragen. Darüber hinaus sind die Signale der mit Cnx1-Intein co-sedimentierten APG8-Proteine (B) nach zwei Waschschritten und (C) nach vier Waschschritten dargestellt. Es wurde jeweils das gesamte Pellet in 20 μ l 1x Lp aufgenommen und auf 17 % SDS-PA-Gelen aufgetrennt.

In **Abb. 2.11 B/C** sind die zur Detektion einer möglichen Co-Sedimentierung mit Cnx1-Intein (nach *Pull Down* bei unterschiedlicher Waschintensität) verwendeten SDS-PA-Gele dargestellt. **Abb. 2.11 B** zeigt für APG8a, b, e, g, h, und i den Verbleib eines Teils des markierten Translats im Pellet der Chitin-Matrix und damit Co-Sedimentation mit Cnx1-Intein. Da dieser Versuch bei einer geringen Waschintensität von zwei Schritten erfolgte, wurde eine Wiederholung des gleichen Ansatzes mit vier Waschschritten durchgeführt (**Abb. 2.11 C**). Es ergab sich dabei eine Abschwächung der Signale von APG8a, b und e, während die Banden von APG8g, h und i unverändert erschienen. Somit sind letztere drei APG8-Proteine mögliche Kandidaten für eine Wechselwirkung mit Cnx1, zumal für APG8h und i bereits im *Dot Overlay Assay* mit Cnx1/Cnx1E entsprechende Indizien gewonnen werden konnten (**Abb. 2.10**) und APG8i darüber hinaus in einem früheren GAL4 *Two Hybrid Screen* als möglicher Interaktionspartner identifiziert wurde (Lindecke, 1999).

(4) Zur Bestätigung eventueller Wechselwirkungen zwischen Cnx1 und APG8-Proteinen wurden GAL4 *Two Hybrid*-Ansätze unternommen. Dabei sollten die Konstrukte APG8a-i *full length*, $\Delta 36$ und $\Delta 36$ GV (pGADT7) gegen Cnx1, Cnx1E und Cnx1G (pGBKT7) auf Interaktion *in vivo* getestet werden. In diesem Zusammenhang konnte hinsichtlich der Cnx1-*Bait*-Konstrukte auf die in 2.1.3.4 geschilderten Vorexperimente zurückgegriffen werden, wonach die Kombination Cnx1G-pGBKT7/pGADT7 zu einer Selbstaktivierung der Reportergene *his3* und *mel1* führte, während dies für Cnx1 bzw. Cnx1E nicht der Fall war. Es wurden zunächst die APG8a-i *full length*-Konstrukte paarweise mit allen drei Cnx1-Varianten in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Wachstum auf SD Leu⁻Trp⁻His⁻ überprüft, was eine schwache Wechselwirkung signalisieren würde. Dieses blieb jedoch bei allen 27 Ansätzen aus. Das ist insbesondere für die Kombinationen mit Cnx1G-pGBKT7 interessant, da die zuvor beobachtete Selbstaktivierung in Gegenwart der GAL4-Aktivierungsdomäne nicht eintrat, was ein Hinweis darauf ist, dass die APG8 *full length*-Konstrukte nicht in den Hefe-Zellkern gelangen.

Nachfolgend wurden die Deletionskonstrukte APG8a-i $\Delta 36$ jeweils parallel mit den Cnx1-pGBKT7-Plasmiden in AH109 transformiert. Dabei stellte sich heraus, dass die APG8a-i $\Delta 36$ -Kombinationen mit Cnx1 bzw. Cnx1E wie bereits im Falle der *full length*-Konstrukte kein Wachstum auf SD Leu⁻Trp⁻His⁻ aufwiesen und somit keine Interaktion angezeigt wurde. Dagegen trat bei allen Paarungen von APG8a-i $\Delta 36$ mit Cnx1G eine *his3*-Aktivierung ein, was dem Phänotyp von Cnx1G in Gegenwart der leeren GAL4-Aktivierungsdomäne entspricht. Aufgrund dieses Befundes konnte auf die Anwesenheit der GAL4-AD und somit der APG8a-i $\Delta 36$ -Fusionskonstrukte im Hefe-Zellkern geschlossen werden. Dementsprechend führte die $\Delta 36$ -Deletion der Tubulin-Bindedomäne offenbar zum gewünschten Ergebnis eines Kernimportes, so dass GAL4 *Two Hybrid*-Untersuchungen auf der Basis von APG8a-i $\Delta 36$ prinzipiell möglich sind. Allerdings ergaben sich keine Hinweise auf Interaktionen mit Cnx1, Cnx1E oder Cnx1G.

In einem letzten Versuchsansatz wurden die APG8a-i $\Delta 36$ GV-Konstrukte mit Cnx1, Cnx1E bzw. Cnx1G in AH109 co-transformiert. Das Ergebnis dieses GAL4 Assays blieb jedoch das gleiche wie das im Falle von APG8a-i $\Delta 36$ erhaltene, so dass damit keiner der *Two Hybrid*-Ansätze Hinweise auf eine Interaktion zwischen Cnx1 und APG8-Proteinen lieferte.

2.1.5 Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: *A. thaliana* Cnx6 und Cnx7

Die Proteine Cnx6 und Cnx7 bilden in heterotetramerer Form den MPT-Synthase-Komplex in *A. thaliana* und katalysieren die Bildung von MPT durch Übertragung zweier Schwefelatome auf Precursor Z. Da MPT gegenüber Sauerstoff sehr empfindlich und daher in freier Form extrem instabil ist, kann angenommen werden, dass es permanent durch umgebende Proteine vor Oxidation geschützt wird. Unter dieser Voraussetzung wurde die Existenz eines Multienzym-

Komplexes postuliert (Schwarz *et al.*, 2000), der mit Cnx5/Cnx6/Cnx7 sowie Cnx1 die Proteine des zweiten und dritten Schritts der Moco-Biosynthese vereinigt und auf diese Weise den freien Zustand des MPT's beim Übergang von der MPT-Synthase auf Cnx1 minimiert. Bisher konnte jedoch noch keine Interaktion von Cnx1 mit anderen Cnx-Proteinen gezeigt werden. Cnx6 und Cnx7 wurden rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt (Gutzke *et al.*, 2001). Für mögliche Cnx1-Interaktionen war die grosse Untereinheit Cnx6 von besonderem Interesse. Das pflanzliche Cnx6-Protein besitzt eine Länge von 198 AS und verfügt über eine C-terminale Extension von etwa 45 AS, die den humanen und bakteriellen Homologen fehlt. Zur Untersuchung auf Cnx1-Bindung sollte Cnx6 sowohl alleine als auch im Komplex mit Cnx7 verwendet werden, dabei kam neben Cnx6 *full length* auch ein Deletionskonstrukt ohne die C-terminale Extension zum Einsatz (Cnx6Δ; K. Fischer, unveröffentlichte Ergebnisse). Zwecks Analyse einer möglichen Wechselwirkung von Cnx1 mit Cnx6/7 wurde die Technik des *Dot Overlay Assays* angewendet, da diese wegen ihrer grossen Sensitivität auch die Detektion schwacher Interaktionssignale erlaubt.

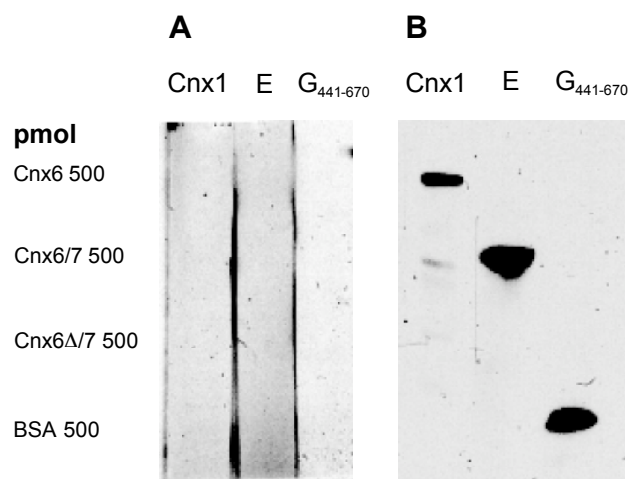


Abb. 2.12 Dot Overlay Assays von Cnx6/Cnx7 mit *in vitro*-translatierten Cnx1-Varianten. (A) zeigt die co-inkubierten Membranabschnitte unter Angabe der Menge an immobilisiertem Protein (links) und jeweiligem Cnx1-Konstrukt (oben). In (B) ist das Kontrollgel der Translation dargestellt (12 % SDS-PA-Gel, Auftrag jeweils 1,5 µl eines 25 µl Translationsansatzes).

Wie aus **Abb. 2.12** ersichtlich ist, konnte dabei jedoch keine Bindung der MPT-Synthase-Proteine an Cnx1 bzw. dessen separate Domänen festgestellt werden. Aufgrund dieses eindeutig negativen Ergebnisses wurden keine weiteren Interaktionsexperimente durchgeführt.

2.1.6 Potentielle Interaktionspartner von Cnx1: *A. thaliana* L12

In einem früheren GAL4 *Two Hybrid Screen* zur Detektion von Cnx1-Interaktionspartnern (Lindecke, 1999) wurden fünf Klone einer cDNA isoliert, die einem putativen ribosomalen Protein L12 zugeordnet werden konnten. Es wurden jedoch damals keine weiteren Experimente unternommen, um eine mögliche Cnx1-Bindung des L12-Proteins zu bestätigen. Zur Untersuchung auf Cnx1-Wechselwirkung wurde die cDNA des L12-Proteins im Rahmen dieser Arbeit über

Erzeugung von *StuI*- und *KpnI*-Restriktionsschnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende in den pQE80-Vektor kloniert, in den zuvor die MCS des pQE30Xa-Plasmids transferiert worden war (2.1.4.1). Damit konnte das L12-Protein als N-terminale *His-Tag* Fusion exprimiert werden, es wurden allerdings keine Parameter gefunden, die zu einer messbaren Expression in löslicher Form führten. Als Konsequenz wurde eine denaturierende Aufreinigung der entstehenden *inclusion bodies* vorgenommen. Von einer ÜN-Vorkultur (*E. coli* BL21 [DE3]) wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 1,0$ bei 37°C inkubiert, bis die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Nach weiteren 15 h Inkubation bei 37°C wurden Zellernte, Aufschluss und Kopplung an die NiNTA-Matrix vorgenommen. Im Anschluss an die Elution konnte das Protein mittels Dialyse in den löslichen Zustand überführt werden und stand in einer Konzentration von 400 µM für weitere Experimente (*Dot Overlay Assays* mit verschiedenen Cnx1-Varianten) zur Verfügung.

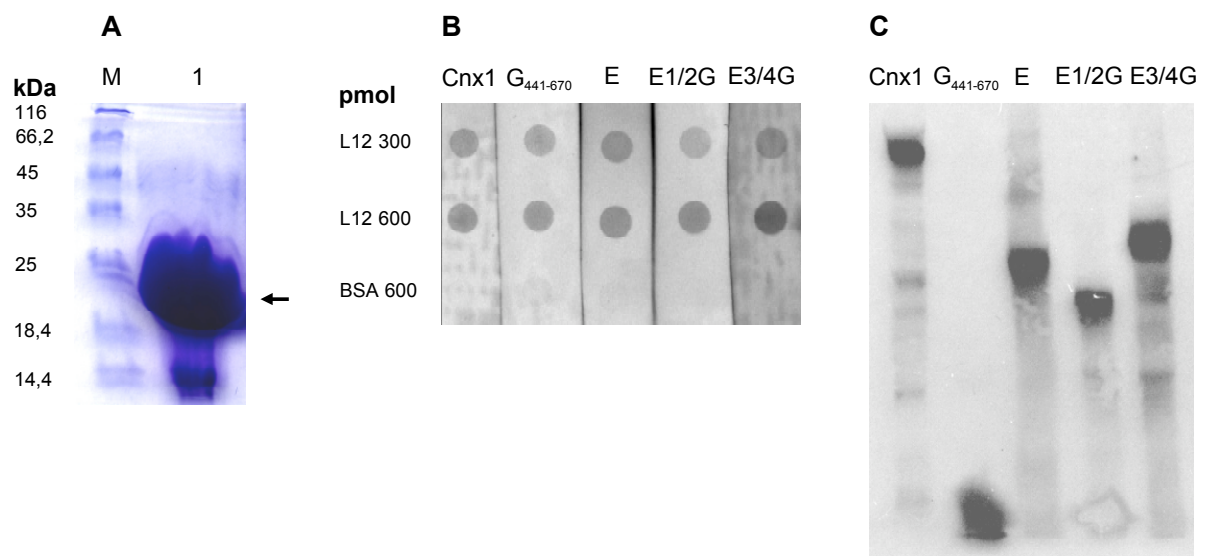


Abb. 2.13 Aufreinigung des L12-Proteins und Dot Overlay Assays mit Cnx1-Varianten. (A) zeigt die Elution des Proteins (2 l Kultur; Ausbeute 42,8 mg) nach denaturierender Aufreinigung und 20 SV Waschen. Der Pfeil zeigt die L12 *His-Tag* Fusion (17,84 kDa). Es wurde ein 20 µl Aliquot auf ein 15 % SDS-PA-Gel aufgetragen und dieses Coomassie-gefärbt. In (B) sind die co-inkubierten Membranabschnitte des *Dot Overlay Assays* unter Angabe der Menge an immobilisiertem Protein (links) und jeweiligem Cnx1-Konstrukt (oben) dargestellt, (C) zeigt das Kontrollgel der Translation (7,5 % SDS-PA-Gel, Auftrag jeweils 1 µl eines 25 µl Translationsansatzes).

Aus **Abb. 2.13** geht hervor, dass alle fünf co-inkubierten Cnx1-Konstrukte an das immobilisierte L12-Protein gebunden wurden. Anhand der Intensität der *dots* ist darüber hinaus eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung zu erkennen (Zunahme von 300 nach 600 pmol L12). Da jedoch keine Unterscheidung zwischen den Cnx1-Domänen möglich und das Vorhandensein je einer Bindungsstelle auf E- und G-Domäne unwahrscheinlich ist, muss von einer unspezifischen L12-Cnx1-Interaktion ausgegangen werden, die vermutlich auch die Ursache für die Identifikation von L12 im GAL4 *Two Hybrid* war. Eine denkbare Erklärung für das undifferen-

zierte Bindungsmuster *in vitro* könnte auch in der denaturierenden Aufreinigung und einer eventuell nicht korrekt erfolgten Rückfaltung des L12-Proteins in den nativen Zustand liegen, zumal ribosomale Proteine in der Regel erst im Komplex mit rRNA die zur Erfüllung ihrer Funktion erforderliche strukturelle Konformation erlangen.

2.2 Suche nach Interaktionspartnern des Cnx1-Proteins mittels USPS *Two Hybrid Screens*

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Durchführung von USPS (*Ubiquitin Split Protein Sensor*) *Two Hybrid Screens* zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner des Cnx1-Proteins aus *A. thaliana*. Wie Teil 2.1 zu entnehmen ist, ergaben die zielgerichteten Untersuchungen von *A. thaliana*-Homologen bekannter Gephyrin-bindender Proteine zwar in ausgewählten Versuchsansätzen Hinweise auf eventuelle Cnx1-Wechselwirkungen (PRF1, APG8g-i), die aber in weitergehenden Experimenten nicht endgültig bestätigt werden konnten.

Eine etablierte Methode zur Identifizierung neuer Interaktionspartner eines Zielproteins (*Bait*) ist die Technik des *Yeast Two Hybrid* (YTH) Assays. Als *in vivo*-Ansatz bedient sich YTH der Hefe *S. cerevisiae* und zeichnet sich insbesondere durch die Möglichkeit eines *Screenings* aus. Dabei wird eine cDNA-Bank zusammen mit dem *Bait*-Protein in einem geeigneten Hefestamm co-exprimiert, wobei es im Falle einer Interaktion zu einer Reporter-gen-Aktivierung und nachfolgend einer Änderung des Phänotyps des Hefeklons kommt. Nach Isolation des Bank-Vektors kann die cDNA analysiert und das codierte Protein direkt auf Wechselwirkung mit dem *Bait*-Protein untersucht werden. Der Vorteil eines YTH *Screens* liegt vor allem darin begründet, dass dabei simultan eine grosse Zahl von cDNA's (i. d. R. mehrere Millionen Klone) auf Interaktion getestet werden kann.

Die „klassische“ Version des YTH ist der GAL4 *Two Hybrid Assay*, mit dem bereits eine Vielzahl neuer Protein-Interaktionen identifiziert werden konnte und der auch im Rahmen dieser Arbeit für zielgerichtete Interaktionstests zum Einsatz kam. Der Nachteil des GAL4 *Two Hybrid Assays* besteht allerdings darin, dass beide Fusionsproteine (*Bait* und *Prey*) in den Hefe-Zellkern gelangen müssen, um dort im Falle einer Interaktion eine Reporter-gen-Aktivierung auszulösen. Zur Durchführung eines *Screens* nach neuen Cnx1-Interaktionspartnern sollte dagegen auf eine Technik zurückgegriffen werden, die sowohl die cytoplasmatische Retention der *Bait*-Fusion als auch potentieller Liganden erlaubt. Mittlerweile wurden neue Methoden zur Detektion von Protein-Interaktionen beschrieben, die die Einschränkungen des GAL4 *Two Hybrid* überwinden. Dabei handelt es sich um das DHFR- (Remy *et al.*, 1999) und das β -Galaktosidase-Komplementationssystem (Rossi *et al.*, 1997), die mit Säugerzellen arbeiten, sowie das G-Protein-Fusionssystem (Ehrhard *et al.*, 2000), das Ras-Rekrutierungssystem (Broder *et al.*,

1998) und USPS (Johnsson *et al.*, 1994a, Johnsson *et al.*, 1994b) für den Einsatz in *S. cerevisiae*. Die leichtere Handhabung von Hefe im Vergleich zu Säugerzellen im allgemeinen sowie die Vorarbeiten zur Identifizierung von Wechselwirkungen mit Transmembran-Proteinen (Wittke *et al.*, 1999, Wittke *et al.*, 2000) und die Verfügbarkeit einer *A. thaliana* cDNA-Bank im speziellen gaben schliesslich den Ausschlag zum Einsatz der USPS-Technik, um nach Cnx1-Interaktionspartnern zu suchen.

2.2.1 Etablierung des Cnx1-Bait-Konstruktes

Das USPS *Two Hybrid*-System wurde speziell zur Detektion von Protein-Wechselwirkungen entwickelt, bei denen ein oder beide Partner im Cytoplasma verbleiben und es somit zum Versagen des GAL4-Prinzips kommt. Die Funktionsweise von USPS ist in **Abb. 2.14** dargestellt.

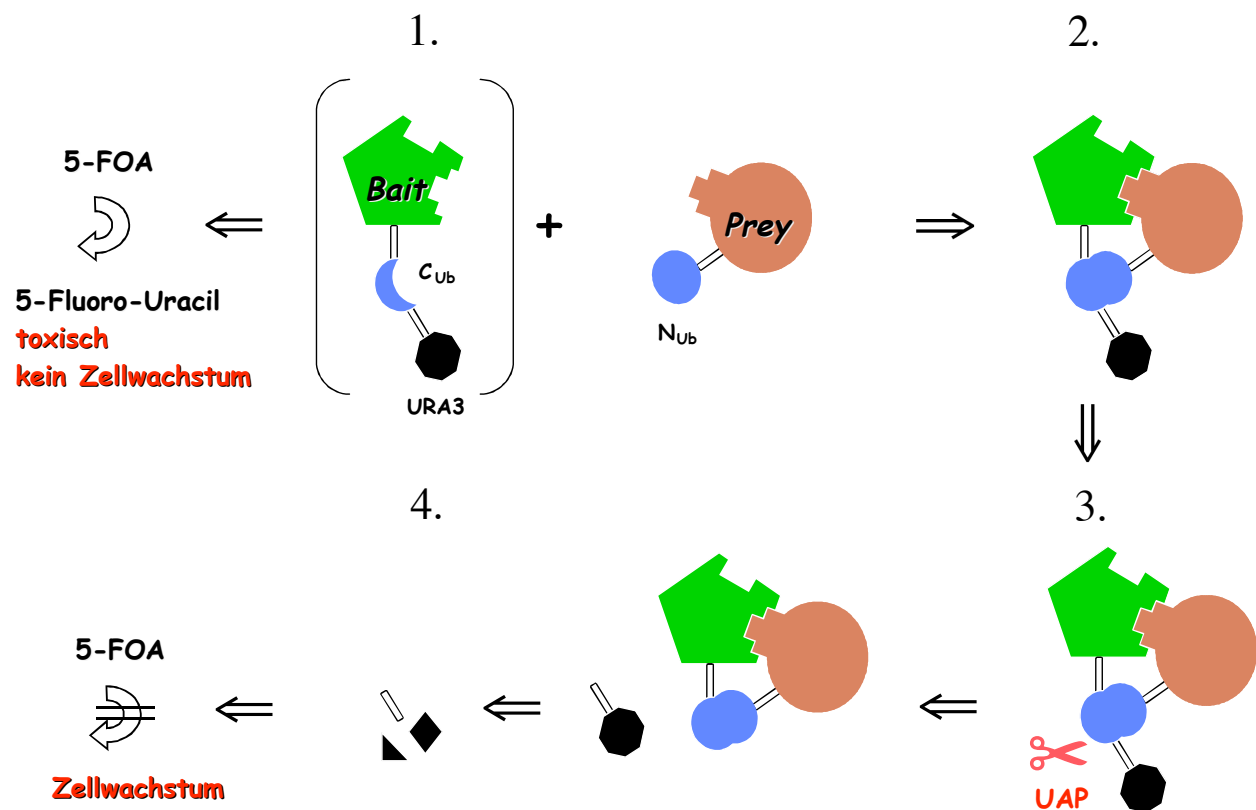


Abb. 2.14 Prinzip des USPS Two Hybrid Screens. Ein Bait-Protein wird mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin (C_{Ub}) und dem Reporter $URA3$ fusioniert. Liegt diese Bait-Fusion allein in einer Hefezelle vor (1.), wandelt sie das Pro-Toxin 5-FOA zu 5-Fluoro-Uracil um, die Zelle stirbt. Kommt es zu einer Interaktion mit einer Prey- N_{Ub} -Fusion (2.), wird funktionales Ubiquitin rekonstituiert, das von einer Ubiquitin-abhängigen Protease (UAP) erkannt wird. Diese spaltet $URA3$ von der Bait-Fusion ab, wodurch dessen Degradation eingeleitet wird (4.). Der Phänotyp der Hefezelle wird 5-FOA-resistent.

In einem ersten Schritt wurde die Cnx1-cDNA durch PCR-Mutagenese so verändert, dass am 5'-Ende eine *EcoRI*- und am 3'-Ende eine *Sall*-Restriktionsschnittstelle entstanden, um eine

Klonierung in den pMet C_{ub} R-URA3-Vektor zu ermöglichen. Dabei wurde der 5'-Primer so angelegt, dass zwischen der *EcoRI*-site („GAATTC“) und dem Startcodon die Sequenz „AAAA“ eingefügt wurde, um die Expression der cDNA in Hefe zu verbessern. Hinsichtlich des 3'-Primers musste darauf geachtet werden, das native Stop-Codon zu beseitigen sowie die *Sall*-Schnittstelle *in frame* mit der für C_{ub} und URA3 codierenden Sequenz anzulegen. Zu diesem Zweck wurde zwischen dem letzten Codon der Cnx1-cDNA („CAC“) und der *Sall*-site („GTCGAC“) die Sequenz „GG“ inseriert. Die Plasmid-Karten des *Bait*-Vektors pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 sowie des *Prey*-Vektors N_{ub} sind in **Abb. 2.15** gezeigt.

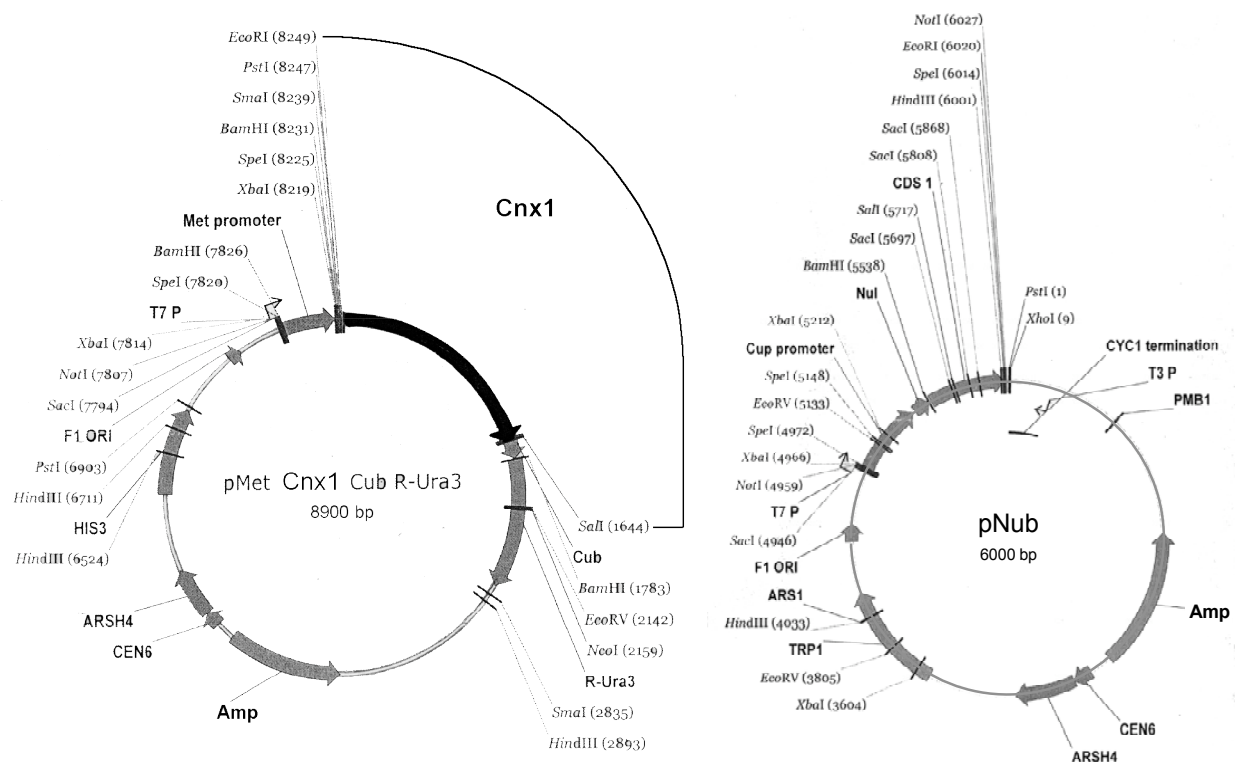


Abb. 2.15 Plasmid-Karten des USPS-*Bait*-Vektors pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 sowie des *Prey*-Vektors pN_{ub}.

Nach erfolgter Klonierung wurde das *Bait*-Konstrukt pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 durch DNA-Sequenzierung auf Fehlerfreiheit untersucht und anschliessend in den Hefestamm JD53 transformiert, um den resultierenden Phänotyp zu überprüfen. Dabei ging es zunächst darum, die stabile Expression der *Bait*-Fusion sowie die Funktionalität der zur Selektion benötigten URA3-Domäne sicherzustellen. Der Transformationsansatz wurde dafür sowohl auf Minimalmedium His⁻Met⁻Ura⁻ als auch auf Minimalmedium His⁻Met⁻FOA⁺ ausgebracht, wobei His⁻ der Selektion des Vektors und Met⁻ der maximalen Expression des *Bait*-Konstruktes dienten. Es konnte festgestellt werden, dass mit pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 transformierte Hefen die Fähigkeit zum Wachstum auf Uracil-Mangelmedium erlangten und darüber hinaus 5-FOA-sensitiv wurden, so dass mit der Funktionalität der *Bait*-Fusion die erste Voraussetzung zur Durchführung eines

USPS *Two Hybrid Screens* gewährleistet war. In einem weiteren Test wurde durch Co-Transformation des *Bait*-Konstruktes mit dem leeren Bank-Vektor pN_{ub} (auf Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺) überprüft, ob es auch in Abwesenheit einer cDNA zu einer Ubiquitin-Reassemblierung und damit zu einer Änderung des Phänotyps von 5-FOA-sensitiv zu 5-FOA-insensitiv kommt, was das *Screening* einer cDNA-Bank ausschliessen würde. Es konnte jedoch keine Selbstaktivierung festgestellt werden. Nachfolgend wurde der gleiche Versuch bei Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an Methionin im Medium (5-20 µM) wiederholt, um festzustellen, wann die Expression der *Bait*-Fusion soweit reprimiert ist, dass ein Umschlag des Phänotyps zu 5-FOA-insensitiv erfolgt. Dieses war bereits in Gegenwart von 10 µM Methionin der Fall.

2.2.2 *Library Screen ohne Induktion der Prey-Expression*

In einem ersten Ansatz wurden 10 µg der pN_{ub}-cDNA-Bank und 20 µg pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 parallel entsprechend dem MATCHMAKER GAL4 *Two Hybrid System 3 & Libraries User Manual* in den Hefestamm JD53 transformiert und auf Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺ ausplattiert. Die Abwesenheit von Methionin garantierte dabei eine hohe Expressionsrate der *Bait*-Fusion, während die Expression der cDNA-Bank aufgrund des Fehlens von CuSO₄ uninduziert erfolgte. Ebenfalls entsprechend o. a. Handbuch wurde die Transformationseffizienz auf 80000 cDNA-Klone berechnet, wobei 63 Klone Wachstum auf Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺ und somit eine mögliche Cnx1-Interaktion zeigten. Von allen 63 5-FOA-insensitiven Klonen wurden Flüssigkulturen angeimpft und wie in 4.4.8 beschrieben eine Plasmidisolierung und -analyse durchgeführt (DNA-Präparation aus Hefe und Transformation in *E. coli* DH5α, DNA-Präparation und Transformation in *E. coli* KC8, DNA-Präparation und DNA-Sequenzierung). Durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits zur DNA-Präparation aus Hefe konnte die Plasmidisolierung deutlich beschleunigt werden. Dabei ergab sich, dass 54 pN_{ub}-Klone nur ein cDNA-Insert aufwiesen, welches nicht *in frame* mit der für N_{ub} codierenden Sequenz war und darüber hinaus innerhalb von max. 24 Basentriplets ein Stop-Codon beinhaltete (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend exprimierten diese Klone nur die N_{ub}-Domäne mit einem kurzen Anhang einer artifiziiellen AS-Abfolge. Die verbleibenden neun Klone sind in **Tab. 2.2** aufgelistet.

Tab. 2.2 Übersicht der im *Library Screen* ohne *Prey*-Induktion identifizierten Klone.

Anzahl	Locus	codiertes Protein	Protein-grösse	Deletionen
1	At1g56075	put. Elongationsfaktor EF2	843 AS	erste 440 AS fehlen
1	At5g10200	exprimiertes Protein	621 AS	erste 419 AS fehlen
1	At2g40140	put. CCCH-Typ Zink Finger Protein	597 AS	-
1	At4g27090	60S Ribosomales Protein L14	135 AS	-
1	At1g27450	Adenin Phosphoribosyltransferase 1 (APRT1)	183 AS	-
1	At3g52130	LTP-family Protein	125 AS	-
1	At5g54270	Lhcb 3 Protein / Chlorophyll a / b bindendes Protein	265 AS	-
2		Rubisco Kleine Untereinheiten		-

Angegeben ist die Anzahl der identifizierten Klone, der genomische *A. thaliana*-Locus (AGI-Code) sowie das von der jeweiligen cDNA codierte Protein, dessen Grösse (Anzahl der Aminosäuren) und eventuelle Deletionen.

Die neun in **Tab. 2.2** aufgeführten pN_{ub}-Klone wurden nachfolgend paarweise mit einer neu präparierten Charge pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 in JD53 retransformiert und auf Minimalmedium His⁺Trp⁺Met⁺FOA⁺ ausplattiert, um die Reproduzierbarkeit des 5-FOA-insensitiven Phänotyps zu überprüfen. Dabei zeigten alle Paarungen erneut Wachstum auf dem Selektivmedium, was als erster Anhaltspunkt für eine tatsächliche Cnx1-Interaktion gewertet werden konnte. Erstaunlich war jedoch die grosse Anzahl von pN_{ub}-Konstrukten, die im *Screen* positiv erschienen, obwohl sie keine sinnvolle N_{ub}-cDNA-Fusion exprimierten. Eine Auswahl (10 Klone) wurde ebenfalls mit pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 retransformiert, wobei der 5-FOA-insensitive Phänotyp verloren ging. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die beiden Ubiquitin-Hälften (C_{ub} und N_{ub}) mit einer geringen Restaffinität auch ohne die Interaktion fusionierter Proteine reassoziieren könnten. Zwar wurde wie o. a. eine Co-Transformation von pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3/pN_{ub} als Negativkontrolle durchgeführt, das pN_{ub}-Plasmid exprimiert allerdings ohne inserierte cDNA bereits eine Fusion der N-terminalen Ubiquitin-Domäne mit 152 Vektor-codierten AS, die bei der Ubiquitin-Rekonstitution interferieren könnten. Im Falle der 54 identifizierten pN_{ub}-Klone mit einem frühen Stop-Codon könnte es jedoch zu einer graduellen Reassoziierung mit der *Bait*-Fusion kommen, so dass die betroffene Hefe-Zelle den toxischen Effekt des 5-FOA enthaltenden Mediums erst verzögert erfährt. In diesem Zeitfenster dürfte ein grosser Selektionsdruck in der Richtung wirken, das *Bait*-Plasmid durch Mutation seiner Expressionsfunktion zu berauben. Gelingt dies, wird die Hefe-Zelle 5-FOA-insensitiv und der entsprechende Klon ist von einem solchen mit einer echten Cnx1-Interaktion nicht mehr zu unterscheiden.

Die in **Tab. 2.2** angegebenen potentiellen Cnx1-Interaktionspartner wurden vorerst nicht in weiteren Versuchsansätzen charakterisiert, da auf der Basis der gewonnenen Erfahrungen zunächst ein verbesserter *Library Screen* (**2.2.3**) durchgeführt werden sollte.

2.2.3 *Library Screen* mit Induktion der *Prey*-Expression

Bei dem in **2.2.2** beschriebenen ersten USPS *Screen* traten vor allem zwei Probleme auf, die eine Identifizierung potentieller Cnx1-Interaktionspartner erschwerten; zum einen die relativ geringe Transformationseffizienz von nur etwa 80000 Klonen und zum anderen die zahlreich detektierten pN_{ub}-Konstrukte mit einem frühen Stop-Codon unmittelbar nach der für N_{ub} codierenden Sequenz.

Um eine höhere Transformationsrate zu erzielen, sollte in einem zweiten *Screen* die Technik der sequentiellen Transformation angewendet werden (**4.4.4.1**). Zu diesem Zweck wurde zunächst das *Bait*-Konstrukt pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 separat in den Hefestamm JD53 transformiert, um dann in einer zweiten Transformation die cDNA-Bank einzubringen. Diese Technik birgt zwar das Risiko, dass den im ersten Schritt transformierten Hefen mehr Zeit zur Mutagenese des *Bait*-Plasmides verbleibt, der Problematik konnte aber vorgebeugt werden, indem die Kultivierung auf SD His⁻Met⁻Ura⁻ erfolgte. Durch das Fehlen von Uracil im Medium sind die Hefen auf eine Expression der Cnx1 C_{ub} R-URA3-Fusion zur Uracil-Biosynthese angewiesen, eine Mutation wäre lethal. Darüber hinaus wurde die eingesetzte cDNA-Menge auf 15 µg erhöht.

Hinsichtlich der zahlreich zu erwartenden pN_{ub}-Stop-Codon-Klone musste ein Weg gefunden werden, diese von tatsächlichen *Bait-Prey*-Interaktionen zu unterscheiden. Hierfür wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, die Expressionsrate der N_{ub}-cDNA-Fusion durch Zugabe von CuSO₄ zu induzieren. Dies würde zum einen dazu führen, dass auch schwach exprimierte bzw. instabile *Prey*-Konstrukte in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen, um ggf. durch Interaktion mit dem Cnx1-*Bait* dessen Degradation auslösen und somit die Wahrscheinlichkeit einer Detektion erhöhen zu können. Zum anderen sollten die im *Screen* unter CuSO₄-Induktion identifizierten Klone in einem zweiten Schritt durch Abgleich des Wachstums auf CuSO₄-freiem Medium analysiert werden. Wäre der 5-FOA-insensitive Phänotyp auf eine Mutation des *Bait*-Konstruktes zurückzuführen, würde kein Unterschied bei der Kultivierung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von CuSO₄ auftreten, da es stets zu einem 5-FOA-resistenten Wachstum käme. Sollte es dagegen zu einem verzögerten bzw. ausbleibenden Wachstum auf Medium ohne CuSO₄ kommen, könnte über den Umweg der verminderten *Prey*-Expression und deren Auswirkung auf die Cnx1 C_{ub} R-URA3-vermittelte 5-FOA-Resistenz sowohl auf die Funktionalität der *Bait*-Fusion als auch auf eine *Bait-Prey*-Interaktion geschlossen werden.

Nach Transformation der cDNA-Bank und 6 Tagen Kultivierung auf Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺CuSO₄⁺ konnten 419 Hefekolonien auf den Selektionsplatten gezählt werden, wobei sich anhand der Kontrollplatten eine Transformationseffizienz von 2,5 Mio. Klonen ergab. Dementsprechend war dieser *Screen* hinsichtlich der erfassten cDNA-Plasmide mehr als 30fach effektiver als der vorherige Ansatz ohne Induktion der *Prey*-Expression, was sowohl auf die um 50 % erhöhte cDNA-Menge als auch auf die Technik der sequentiellen Transformation zurückzuführen war. Von allen positiven Klonen wurde ein Aliquot entnommen und in 500 µl sterilem H₂O resuspendiert. Jeweils 20 µl dieser Zellsuspension wurden parallel auf Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺CuSO₄⁺/CuSO₄⁻ ausgebracht. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Wachstumsraten der parallel angezogenen Klone verglichen. Während die CuSO₄ enthaltenden Kontrollplatten in allen Fällen dichten Bewuchs der Hefen zeigten, konnte bei 324 Klonen eine Verminderung bzw. ein Ausbleiben des Wachstums beobachtet werden, so dass diese Klone zur weiteren Analyse ausgewählt wurden.

Aufgrund der grossen Anzahl zu analysierender Hefeklone musste eine effektive Methode zur Identifizierung der cDNA-Inserts entwickelt werden, da eine Plasmidisolierung, auch bei Einsatz der verbesserten Technik unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits, zu aufwändig gewesen wäre (zusammengefasst in **Abb. 2.16**). Zunächst wurde mittels *Yeast Colony* PCR eine direkte Amplifikation der cDNA-Sequenzen durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Ansätze wurden ohne weitere Aufreinigung für Restriktionsverdau mit den Endonukleasen AluI und HaeIII („*frequent cutting enzymes*“) eingesetzt, so dass für jeden Klon eine erste Charakterisierung auf der Basis der Fragmentgrösse sowie eines Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) vorgenommen werden konnte. Auf diese Weise konnte der zeitliche Rahmen der Analyse (bei Plasmidisolierung wegen der Inkubationszeiten von *S. cerevisiae* bzw. *E. coli* mindestens 10 Tage) auf einen Tag verkürzt werden. Darüber hinaus wurde es möglich, redundant auftretende cDNA's frühzeitig in Gruppen einzuordnen und weitere Untersuchungen auf jeweils einen Vertreter pro Gruppe zu beschränken. In diesen Fällen wurden die PCR-Fragmente aus einem Agarosegel aufgereinigt, um nachfolgend eine DNA-Sequenzierung vornehmen zu können.

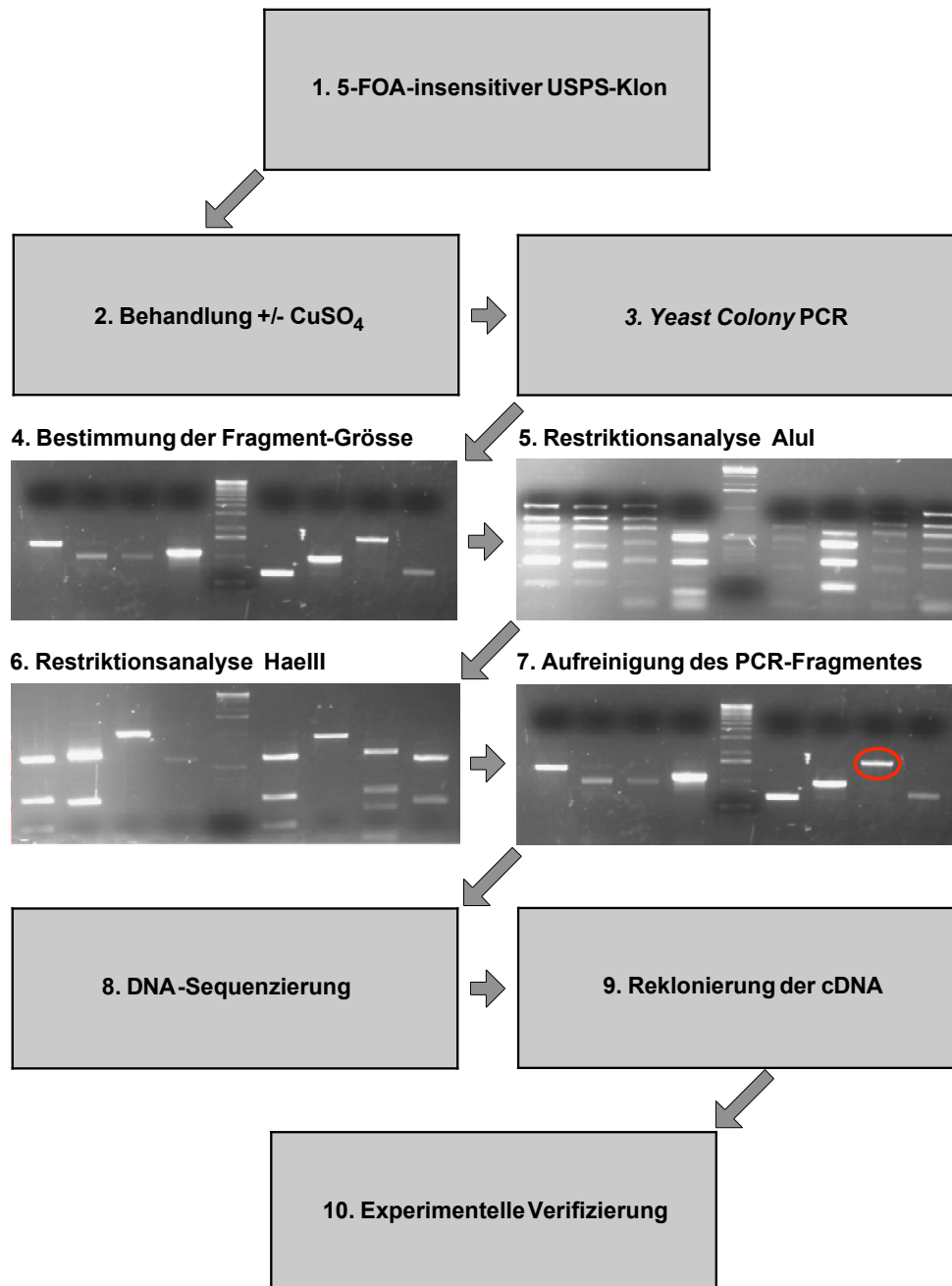


Abb. 2.16 Schema der beschleunigten Charakterisierung von positiven USPS-Klonen unter Verwendung der *Yeast Colony PCR* und RFLP-Analyse.

Als Resultat der Sequenzanalyse wurden erneut 41 *Prey*-Klone identifiziert, die lediglich eine Fusion der N-terminalen Ubiquitin-Domäne mit einem kleinen cDNA-Fragment darstellten (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten 17 einzeln auftretende Klone bestimmt werden, die (bis auf zwei Ausnahmen mit Deletionen) vollständige cDNA's *in frame* mit N_{ub} exprimierten (**Tab. 2.3**).

Tab. 2.3 Übersicht der im *Library Screen* mit *Prey*-Induktion identifizierten einfach auftretenden Klone.

Anzahl	Locus	codiertes Protein	Protein-grösse	Deletionen
1	At1g62740	put. Stress induzierbares Protein	571 AS	-
1	At4g17190	Farnesyl Pyrophosphat Synthase 2	247 AS	-
1	At1g20140	put. E3 Ubiquitin Ligase SCF Komplex Untereinheit	163 AS	-
1	At2g24940	put. Steroid bindendes Protein, put. Cytochrom b5 Domäne enthaltendes Protein	100 AS	-
1	At5g12140	put. Cystatin, put. Cystein Protease Inhibitor	101 AS	-
1	At4g39260	put. Glycin-reiches RNA bindendes Protein	110 AS	-
1	At5g08290	YLS 8/DIM 1 ähnliches Protein/put. Thioredoxin ähnliches U5 snRNP Protein	142 AS	-
1	At5g14200	3-Isopropylmalat Dehydrogenase, chloropl.	409 AS	-
1	At3g43810	Calmodulin 7 (CAM7)	149 AS	-
1	At4g23670	put. major Latex Protein	152 AS	-
1	At1g33040	NAC-Domäne enthaltendes Protein	209 AS	-
1	At1g22840	put. Cytochrom C	114 AS	-
1	At2g41650	exprimiertes Protein	66 AS	-
1	At2g27710	60S Ribosomales Protein P2	115 AS	-
1	At3g01850	put. Pentose-5-Phosphat 3-Epimerase	225 AS	erste 4 AS fehlen
1	At2g42680	put. Ethylene-resp. Transkriptions-Koaktivator	142 AS	-
1	<u>At1g66240</u>	<u>put. Kupfer-Chaperon, put. Kupfer-Homöostase Faktor (CCH)</u>	106 AS	erste 11 AS fehlen

Angegeben ist die Anzahl der identifizierten Klone, der genomische *A. thaliana*-Locus (AGI-Code) sowie das von der jeweiligen cDNA codierte Protein, dessen Grösse (Anzahl der Aminosäuren) und eventuelle Deletionen. Der zur weiteren Analyse ausgewählte Klon ist unterstrichen sowie die im folgenden verwendete Kurzbezeichnung in Klammern gesetzt.

Die verbleibenden 266 *Prey*-Klone wurden mehrfach identifiziert und waren daher für weitere Analysen von besonderem Interesse. Bei Identifizierung von cDNA's eng homologer Proteine wurde dies als mehrfaches Auftreten gewertet und in **Tab. 2.4** in gemeinsamen Zeilen aufgeführt (Glutathion S-Transferasen, Cyclophiline, Metallothioneine).

Tab. 2.4 Übersicht der im *Library Screen* mit *Prey*-Induktion identifizierten mehrfach auftretenden Klone.

Anzahl	Locus	codiertes Protein	Protein-grösse	Deletionen
1	<u>At2g30860</u>	<u>put. Glutathion S-Transferase (GST)</u>	215 AS	-
1	<u>At1g78370</u>	<u>put. Glutathion S-Transferase (GST)</u>	217 AS	-
2	<u>At4g29350</u>	<u>Profilin 2 (PRF2)</u>	131 AS	-
2	<u>At2g34470</u>	<u>put. Nickel-/ Nukleotid-bindendes Urease Hilfs-Protein (UreG)</u>	275 AS	-
2	<u>At1g65980</u>	<u>Peroxiredoxin, Thioredoxin abh. Peroxidase (TPX1)</u>	162 AS	-
1	<u>At5g39950</u>	<u>Thioredoxin H-Typ 2 (TRX-H-2)</u>	133 AS	erste 5 AS fehlen
3	<u>At5g42980</u>	<u>Thioredoxin H-Typ 3 (TRX-H-3)</u>	118 AS	-
5	<u>At3g56490</u>	<u>put. Nukleotid-Hydrolase (HIT)</u>	147 AS	erste 4/6/16/19 AS fehlen
6	<u>At1g27450</u>	<u>Adenin Phosphoribosyltransferase 1 (APRT1)</u>	183 AS	-
13	<u>At1g13930</u>	<u>exprimiertes Protein (F16A14.27)</u>	155 AS	-
5	<u>At2g16600</u>	<u>cytos. Cyclophilin (ROC3)</u>	173 AS	-
11	<u>At4g34870</u>	<u>Cyclophilin 1 (CYP1)</u>	172 AS	-
1	<u>At3g15353</u>	<u>put. Metallothionein</u>	69 AS	-
4	<u>At1g07600/</u> <u>At1g07590</u>	<u>Metallothionein (MT1a / 1c)</u>	45 AS	-
43	<u>At3g09390</u>	<u>put. Metallothionein (MT2A)</u>	81 AS	-
166		Rubisco Kleine Untereinheiten		-

Angegeben ist die Anzahl der identifizierten Klone, der genomische *A. thaliana*-Locus (AGI-Code) sowie das von der jeweiligen cDNA codierte Protein, dessen Grösse (Anzahl der Aminosäuren) und eventuelle Deletionen. Zur weiteren Analyse ausgewählte Klone sind unterstrichen sowie die im folgenden verwendeten Kurzbezeichnungen in Klammern gesetzt.

Zur Auswahl der für weitere Analysen in Frage kommenden potentiellen Cnx1-Interaktionspartner wurde grundsätzlich eine wiederholte Detektion der entsprechenden cDNA im *Screen* (**Tab. 2.4**) als ausschlaggebendes Kriterium betrachtet. Es kann jedoch bei einer grösseren Anzahl von identifizierten Klonen nicht unmittelbar auf eine höhere Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung geschlossen werden, da die jeweiligen cDNA's in der verwendeten Bank sehr unterschiedlich häufig repräsentiert sein können. Dementsprechend waren auch die einzeln detektierten *Prey*-Klone in **Tab. 2.3** als mögliche Interaktionspartner von Cnx1 zu betrachten. In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse war das put. Kupfer-Chaperon CCH (At1g66240), da durch die Arbeiten von Kuper *et al.* (2004) gezeigt werden konnte, dass die Cnx1 G-Domäne adenyliertes MPT bindet, welches ein Kupfer-Atom über seine Dithiol-

Gruppierung ligandiert (Cu-MPT-AMP). Im Zuge der nachfolgenden Molybdän-Insertion durch Cnx1E wird das Kupfer-Atom freigesetzt, so dass dessen Aufnahme durch ein Chaperon, begünstigt durch eine mögliche Cnx1-Interaktion, zweckmässig wäre. Darüber hinaus konnten zwei pN_{ub}-Klone identifiziert werden, die für PRF2 (At4g29350) codieren. In Analogie zur Profilin-Gephyrin-Interaktion bei Säugern waren pflanzliche Profiline bereits als potentielle Cnx1-Interaktionspartner postuliert und auch im Zuge dieser Arbeit eingehend untersucht worden (**2.1.3**). Die Detektion von PRF2 lieferte nun sowohl ein Indiz dafür, dass Profiline auch in Pflanzen eine Verbindung zwischen dem dritten Schritt der Moco-Biosynthese (Cnx1) und der Aktin-filament-Dynamik darstellen, als auch für die grundsätzliche Funktionalität des USPS *Screens* auf der Basis von Cnx1 als *Bait*-Konstrukt.

Auffällig war das häufige Auftreten von codierenden Sequenzen der Kleinen Untereinheiten der Rubisco (Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase) mit insgesamt 166 Klonen. Da ein entsprechendes Phänomen bereits bei früheren USPS *Screens* mit anderen *Bait*-Proteinen beobachtet werden konnte (C. Consonni, persönliche Mitteilung), wurden diese Klone nicht weiter analysiert. Vereinzelt waren auch Metallothioneine und Cyclophiline als falsch positive Klone identifiziert worden, allerdings traten diese cDNA's in weit geringeren Zahlen auf als im aktuellen USPS *Screen*, so dass hier eine Wechselwirkung mit Cnx1 nicht prinzipiell ausgeschlossen werden konnte.

Unter den einzeln identifizierten Klonen (**Tab. 2.3**) wurde zunächst nur das Kupfer-Chaperon CCH für weitere Experimente in Betracht gezogen, da hinsichtlich der übrigen Proteine nach derzeitigem Kenntnisstand keine Parallelen zur Cnx1-Funktion erkannt werden konnten. Neben PRF2, dem Metallothionein MT2A und Cyclophilin CYP1 wurden sieben weitere Proteine aufgrund ihres wiederholten Auftretens im *Screen* zur weiteren biochemischen und zellbiologischen Analyse einer möglichen Cnx1-Wechselwirkung ausgewählt (in **Tab. 2.4** unterstrichen). Bei Homologen wurde der häufiger repräsentierte Klon herangezogen.

2.2.4 Experimentelle Analysen zur Verifizierung potentieller Cnx1-Interaktionspartner

Im Zuge eines *Two Hybrid Screens* identifizierte potentielle Interaktionspartner eines *Bait*-Proteins müssen zunächst weitergehende Analysen durchlaufen, bevor von einer *in vivo*-Wechselwirkung ausgegangen werden kann. Zwar ist es möglich, mit entsprechenden Versuchsansätzen in grossem Massstab Interaktionstests durchzuführen (2,5 Mio. erfasste cDNA's im aktuellen USPS *Screen* mit *Prey*-Induktion), sie sind aber auch dafür bekannt, u. U. zu falsch positiven Resultaten zu führen. So kann es bei Verwendung des GAL4-Systems auch in Abwesenheit eines Interaktionspartners zur Aktivierung von Reportergenen kommen, wie für

pGBKT7-Cnx1G festgestellt (**2.1.3.4**). In Bezug auf USPS besteht ein Problem in der offensichtlichen Restaffinität der getrennten Ubiquitin-Hälften (C_{ub} und N_{ub}), was in der Identifizierung von *Prey*-Klonen mit einem frühen Stop-Codon resultierte. Darüber hinaus ist es möglich, dass eine *Prey*-Fusion nicht an das Zielprotein bindet, sondern innerhalb des *Bait*-Konstruktes mit C_{ub} oder R-URA3 interagiert und so ebenfalls zur Änderung des Phänotyps führt. In einem solchen Mechanismus bestünde beispielsweise eine denkbare Erklärung zur wiederholten Identifizierung von cDNA's unabhängig vom eingesetzten *Bait*-Protein (wie z. B. die kleinen Untereinheiten der Rubisco).

2.2.4.1 *In vivo*-Co-Lokalisierungsexperimente von GFP-Cnx1 mit DsRed-Fusionen potentieller Liganden

Eine Methode, Hinweise auf Protein-Interaktionen zu gewinnen, besteht in Co-Lokalisierungsversuchen *in vivo*. Vom humanen Cnx1-Homologen Gephyrin ist bekannt, dass es bei Expression in nicht-neuronalem Gewebe (z. B. HEK293-Zellen) intrazelluläre Aggregate („blobs“) bildet. Diese können bei einer Fluoreszenzmarkierung des Proteins mikroskopisch sichtbar gemacht oder durch Verwendung von Antikörpern detektiert werden. Anders als bei einer diffusen Verteilung bietet sich dadurch die Möglichkeit, einen potentiellen Liganden als Interaktionspartner zuzuordnen, wenn sich dessen Verteilung bei einer Co-Expression um die/in den Aggregate(n) des Zielproteins konzentriert. Aufgrund der hochgradigen Homologie zwischen Gephyrin und Cnx1 wurde das Lokalisierungsmuster von GFP-fusioniertem Cnx1 in HEK293-Zellen untersucht (Koenig, 2004), wobei sich eine Gephyrin-analoge Ausbildung von Aggregaten ergab (**Abb. 2.17**).

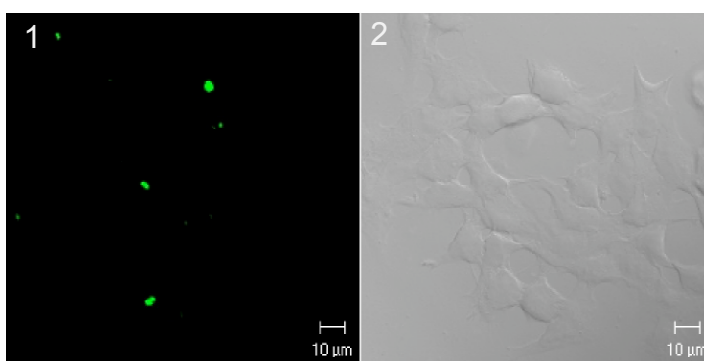


Abb. 2.17 Transfektion humaner HEK293-Zellen mit GFP-Cnx1. Die Teilbilder zeigen das GFP-Signal (1) sowie die Durchlichtaufnahme (2).

Angeichts der leichten Transfizierbarkeit im Vergleich zu den zum DNA-Transfer in pflanzliche Zellen verfügbaren Techniken (z. B. mittels Partikelkanone) sollten im Rahmen dieser Arbeit Co-Lokalisierungsexperimente von Cnx1 und putativen Liganden in humanen Zellen durchgeführt werden. Dabei wurde (neben dem Einsatz von *S. cerevisiae*) die Verwendung eines weite-

ren heterologen Systems gewählt, um ggf. ein Werkzeug zur raschen Unterscheidung zwischen falsch positiven USPS-Klonen und tatsächlichen Liganden zu erhalten, so dass weitergehende biochemische Interaktionsnachweise auf einen kleineren Kreis von Kandidaten beschränkt werden könnten. Für Co-Transfektionen mit dem vorhandenen pEGFP-C2-Cnx1-Konstrukt (Koenig, 2004) wurden die codierenden Sequenzen der 11 potentiellen Interaktionspartner in den pDsRed-N1-Vektor kloniert. Die entsprechenden cDNA's wurden zu diesem Zweck mittels PCR auf Basis der pGAD10-Bank amplifiziert und mit *KpnI*- bzw. *BamHI*-Restriktionsschnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende versehen. Dabei wurde jeweils das Stop-Codon durch Einfügen der *BamHI*-Schnittstelle eliminiert und diese so platziert, dass die Expression des Inserts *in frame* mit der C-terminalen DsRed-Domäne erfolgte.

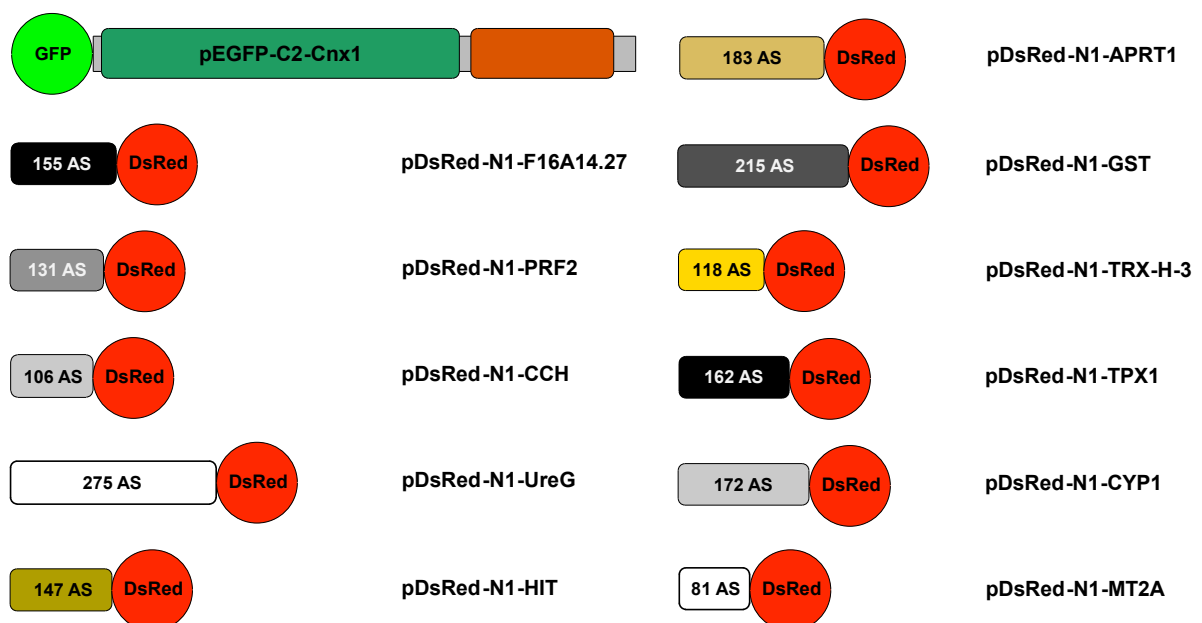


Abb. 2.18 Schema der DsRed-fusionierten potentiellen Liganden und GFP-Cnx1. Angegeben ist die Kurzbezeichnung der Konstrukte in Verbindung mit der jeweiligen Protein-Grösse (Anzahl der Aminosäuren). Die exakten Angaben zu den Proteinen sind **Tab. 2.3** bzw. **2.4** zu entnehmen.

Die in **Abb. 2.18** aufgeführten DsRed-Konstrukte wurden jeweils paarweise mit GFP-Cnx1 in HEK293-Zellen transfiziert und auf mögliche Co-Lokalisierung untersucht. Im Falle von DsRed-HIT (**Abb. 2.19 A/C**) und DsRed-TPX1 konnte eine Konzentration in Aggregaten festgestellt werden, die aber unabhängig von den GFP-Cnx1-Signalen auftraten und mit diesen nicht zur Deckung kamen. Für alle anderen Kombinationen ergab sich eine diffuse Verteilung der DsRed-Fusion und somit keine Co-Lokalisierung mit Cnx1 (in **Abb. 2.19 B/D** exemplarisch dargestellt für GFP-Cnx1 und DsRed-GST). Es konnte daher anhand dieses Ansatzes für keinen der 11 möglichen Interaktionspartner ein Hinweis auf eine tatsächliche Cnx1-Wechselwirkung erbracht werden.

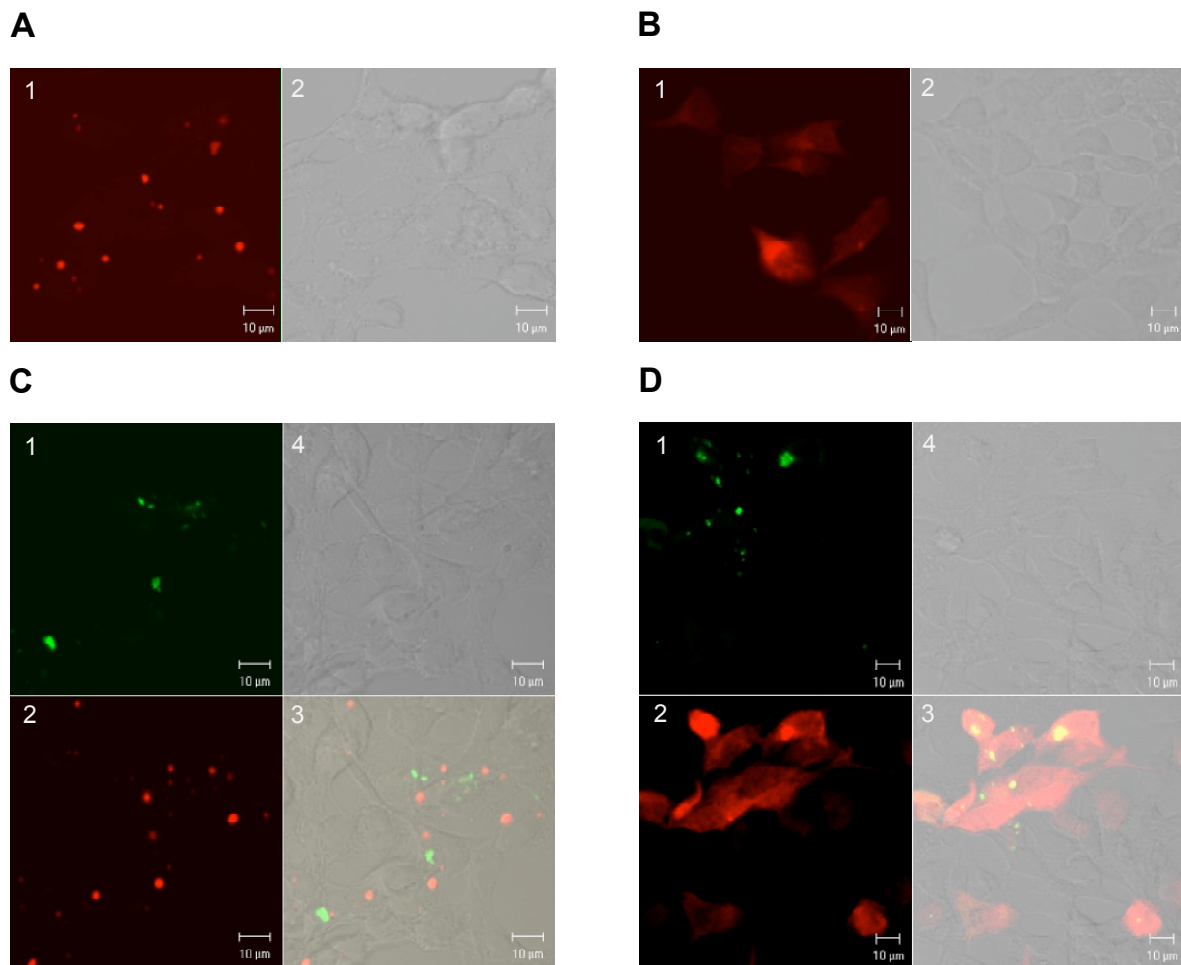


Abb. 2.19 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektion humaner HEK293-Zellen mit DsRed-gekoppelten putativen Cnx1-Interaktionspartnern sowie von Co-Transfektionen dieser Varianten mit GFP-Cnx1. In (A) und (B) sind Kontroll-Transfektionen von DsRed-HIT bzw. von DsRed-GST mit (1) dem DsRed-Signal und (2) der Durchlichtaufnahme dargestellt. (C) und (D) zeigen Co-Transfektionen von GFP-Cnx1 mit DsRed-HIT bzw. von GFP-Cnx1 mit DsRed-GST. Die Teilbilder zeigen die Signale von Cnx1 (1), des put. Liganden (2), die Überlagerung von 1 und 2 (3) sowie die Durchlichtaufnahme (4).

2.2.4.2 *In vivo*-Co-Lokalisierungsexperimente von DsRed-Cnx1 mit GFP-Fusionen potentieller Liganden

Das negative Resultat aus **2.2.4.1** (keine Co-Lokalisierung von GFP-Cnx1 mit DsRed-Fusionen der putativen Liganden) musste nicht zwangsläufig zu dem Schluss führen, dass der entsprechende Ansatz der Transfektion in humane Zellen zur Detektion von Cnx1-Interaktionen unbrauchbar ist. Eine in Frage kommende Fehlerquelle bestand darin, dass der an Cnx1 gekoppelte GFP-Tag mit möglichen Liganden-Bindungsstellen interferiert. Aus Versuchen zur Erzeugung gegen Gephyrin gerichteter Antikörper war bekannt, dass in der 3D-Struktur des *holo*-Proteins Bereiche der E-Domäne (insbesondere die Subdomänen 1 und 2) oberflächenexponiert sind (G. Schwarz, unveröffentlichte Ergebnisse). Darüber hinaus konnte für keinen der bislang identifizierten Gephyrin-Interaktionspartner eine Bindung an die G-Domäne nachgewie-

sen werden. Dementsprechend war auch für potentielle Cnx1-Liganden eine Wechselwirkung mit der E-Domäne als wahrscheinlich anzunehmen. Bei dem in **2.2.4.1** verwendeten Cnx1-Konstrukt befindet sich der GFP-Tag (240 AS) am N-Terminus und ist somit an die E-Domäne fusioniert, so dass eine Blockierung möglicher Bindungsstellen nicht ausgeschlossen werden konnte. Für die erfolgreichen Co-Lokalisierungsversuche mit dem intrazellulären Loop der Glycin-Rezeptor β -Untereinheit (Koenig, 2004) wurde eine ebenfalls N-terminale GFP-Fusion von Gephyrin eingesetzt, wegen der im Vergleich zu Cnx1 invertierten Domänenanordnung bedeutet dies jedoch eine Kopplung des Tags an die G-Domäne. Es sollte daher in einem weiteren Ansatz ein Cnx1-Konstrukt mit einer C-terminalen Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Cnx1-cDNA nach Einführung von *EcoRI*- bzw. *Sall*-Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende in den pDsRed-N1-Vektor kloniert. Aufgrund der Änderung der Fluoreszenzemission von grün nach rot mussten nachfolgend die codierenden Sequenzen der potentiellen Liganden in entgegengesetzter Richtung vom pDsRed-N1- in den pEGFP-C2-Vektor umkloniert werden, wodurch sich die Position des Fluoreszenz-Tags von C- nach N-terminal änderte (**Abb. 2.20**). Für diese Reklonierung konnten die *KpnI*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen der entsprechenden pDsRed-Konstrukte verwendet werden (**2.2.4.1**).

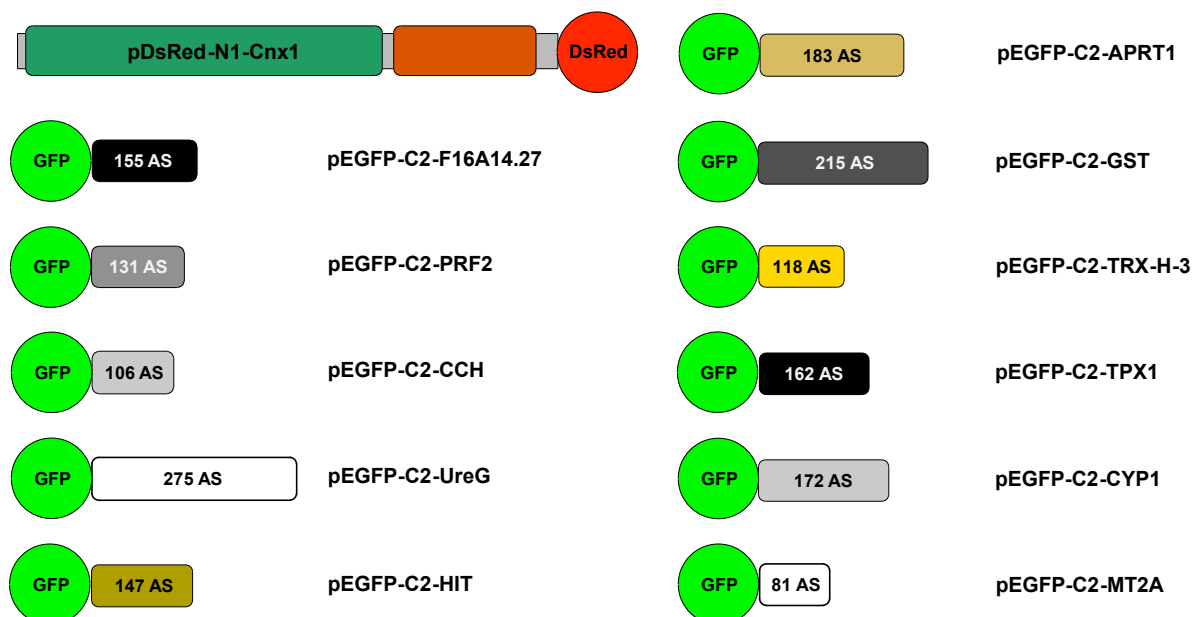


Abb. 2.20 Schema der GFP-fusionierten potentiellen Liganden und DsRed-Cnx1. Angegeben ist die Kurzbezeichnung der Konstrukte in Verbindung mit der jeweiligen Protein-Grösse (Anzahl der Aminosäuren). Die exakten Angaben zu den Proteinen sind **Tab. 2.3** bzw. **2.4** zu entnehmen.

Die pDsRed-Cnx1-Fusion wurde zunächst separat in HEK293-Zellen transfiziert, wobei es zu einer vergleichbaren Ausbildung von Aggregaten kam, wie bereits für GFP-Cnx1 beobachtet (**Abb. 2.21**).

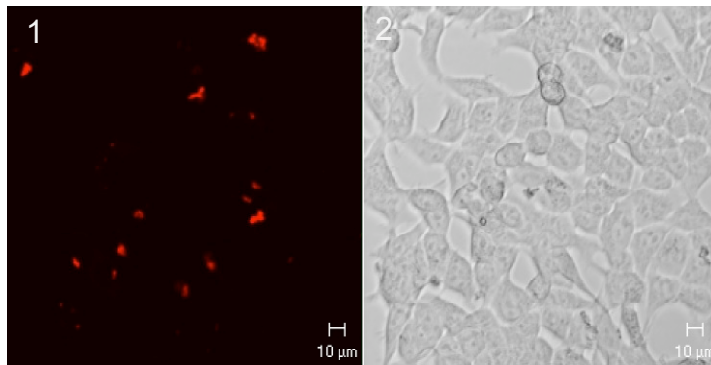


Abb. 2.21 Transfektion humaner HEK293-Zellen mit DsRed-Cnx1. Die Teilbilder zeigen das DsRed-Signal (1) sowie die Durchlichtaufnahme (2).

Nachfolgend wurden die in **Abb. 2.20** aufgeführten GFP-Konstrukte jeweils paarweise mit DsRed-Cnx1 in HEK293-Zellen transfiziert und auf mögliche Co-Lokalisierung untersucht. Dabei war in allen Fällen zu beobachten, dass transfizierte Zellen einen abgerundeten Phänotyp entwickelten und nicht mehr adhärent wuchsen. Gleiches trat auch ein, wenn die Zellen allein mit den GFP-Konstrukten der potentiellen Liganden transfiziert wurden (**Abb. 2.22 A/B**). Offensichtlich führte die Expression der N-terminalen GFP-Fusionen in den betroffenen Zellen generell zu toxischen Effekten, aus denen der beschriebene irreguläre Phänotyp resultierte. Wie in **Abb. 2.22 C** und **D** dargestellt, konnten für die Kombinationen von DsRed-Cnx1 mit GFP-HIT sowie DsRed-Cnx1 mit GFP-UreG in etwa 20-30 % der Fälle Co-Lokalisierungen festgestellt werden, wobei aber wegen des schlechten Zustands der Zellen nicht auszuschliessen war, dass es sich dabei um Artefakte handelte.

Alle 11 Kombinationen aus pDsRed-Cnx1 und GFP-Fusionen der putativen Interaktionspartner wurden in einem weiteren Ansatz in humane HeLa-Zellen transfiziert, es stellte sich aber auch in diesem Zusammenhang der bei Transfektion der HEK293-Zellen beobachtete Phänotyp ein (Daten nicht gezeigt). Somit musste der Versuch der Verifizierung von Cnx1-Liganden durch Co-Lokalisierung in humanen Zellen als nur bedingt brauchbar betrachtet werden.

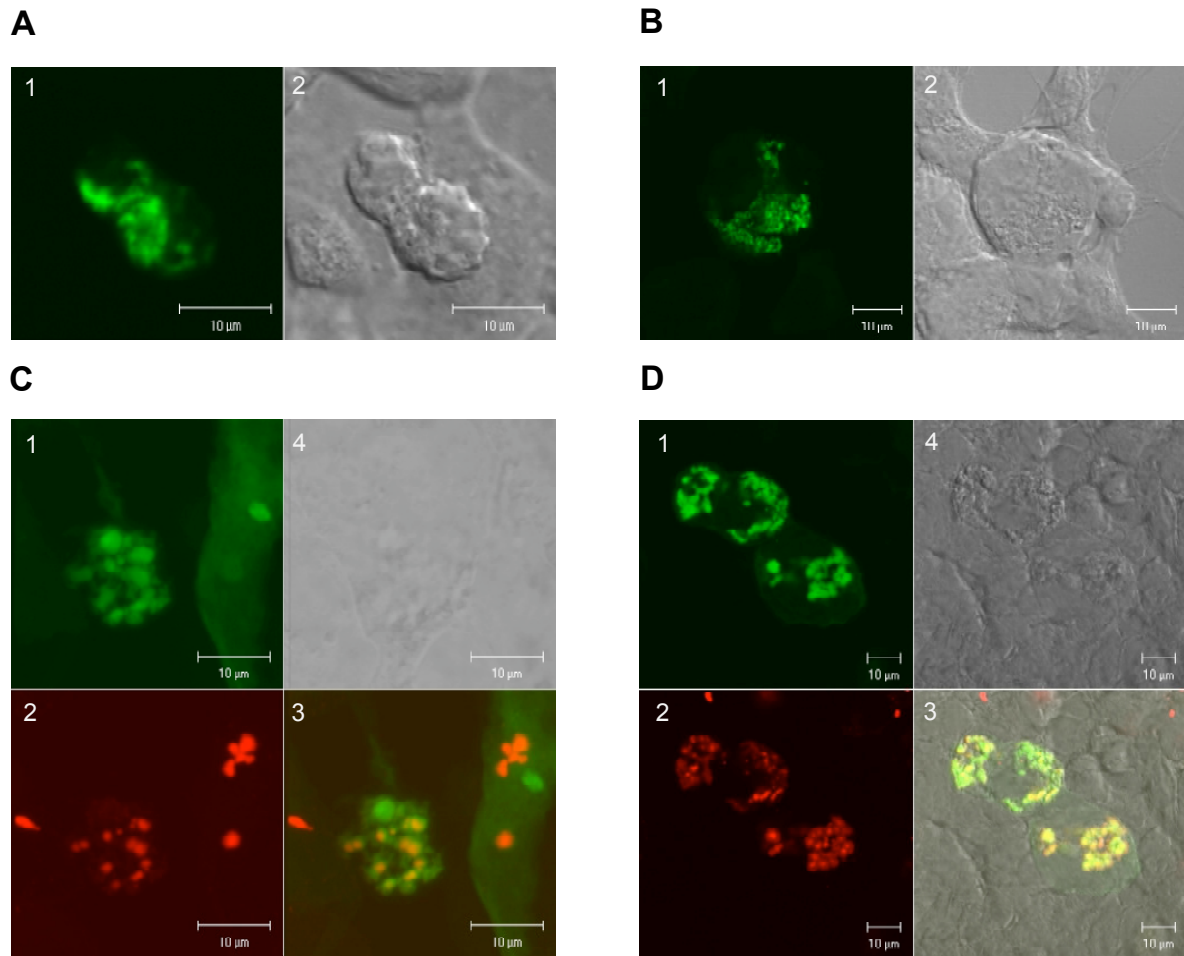


Abb. 2.22 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektion humaner HEK293-Zellen mit GFP-gekoppelten putativen Cnx1-Interaktionspartnern sowie von Co-Transfektionen dieser Varianten mit DsRed-Cnx1. In (A) und (B) sind Kontroll-Transfektionen von GFP-HIT bzw. von GFP-UreG mit (1) dem GFP-Signal und (2) der Durchlichtaufnahme dargestellt. (C) und (D) zeigen Co-Transfektionen von DsRed-Cnx1 mit GFP-HIT bzw. von DsRed-Cnx1 mit GFP-UreG. Die Teilbilder zeigen die Signale des put. Liganden (1), von Cnx1 (2), die Überlagerung von 1 und 2 (3) sowie die Durchlichtaufnahme (4).

2.2.4.3 Klonierung, Expression und Aufreinigung von *Intein*-Fusionen potentieller Liganden

Für direkte biochemische Interaktionstests mit Cnx1 sollten die im USPS *Screen* identifizierten potentiellen Liganden rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Im Vergleich zu den Versuchen zur Co-Lokalisierung wurde die Auswahl der möglichen Interaktionspartner auf acht reduziert. Die Proteine MT2A, CYP1 und TPX1 wurden von weiteren Untersuchungen ausgenommen, da in diesen Fällen aufgrund der Ergebnisse aus *Screens* anderer Arbeitsgruppen (Einstufung als falsch positiv; C. Consonni, persönliche Mitteilung) mit der geringsten Wahrscheinlichkeit einer Cnx1-Wechselwirkung gerechnet werden konnte. Zur Aufreinigung der verbliebenen potentiellen Liganden wurde eine Expression als *Intein*-Fusion gewählt, da das jeweilige Protein sowohl an Chitin-Matrix gekoppelt für *Pull Down Assays* verwendet werden kann als

auch nach Abspaltung vom Affinitäts-Tag für weitere Experimente (wie z. B. ELISA) zur Verfügung steht. Die jeweiligen cDNA's wurden durch PCR-Mutagenese mit *NdeI*- bzw. *XmaI*-Restriktionsschnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende versehen und in den pTYB12-Vektor integriert (**Abb. 2.23**). Auf diese Weise konnte eine Expression als N-terminale *Intein*-Fusion erfolgen, wobei diese Konfiguration in Analogie zum USPS *Prey*-Vektor (N-terminale N_{ub}-Fusion) gewählt wurde.

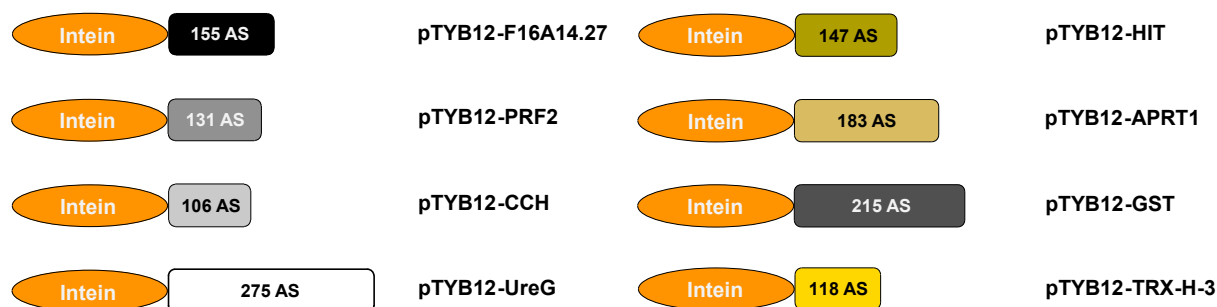


Abb. 2.23 Schema der *Intein*-Fusionen potentieller Cnx1-Liganden. Angegeben ist die Kurzbezeichnung der Konstrukte in Verbindung mit der jeweiligen Protein-Grösse (Anzahl der Aminosäuren).

Die Expression der pTYB12-Konstrukte erfolgte standardmässig mittels *E. coli* BL21 (DE3). Aus einer ÜN-Vorkultur wurde die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert, bevor die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Anschliessend wurde für weitere 15 h bei 30°C inkubiert und daraufhin Zellernte und Aufschluss vorgenommen. Es wurden jeweils 2 l Expressionskulturen verwendet und das Lysat zunächst zur Kopplung an 300 µl Chitinmatrix verwendet, um eine hohe Saturierung für *Pull Down*-Experimente zu erzielen (**Abb. 2.24**). Anschliessend erfolgte die Kopplung des verbliebenen Proteins an 3 ml Chitinmatrix zur späteren Abspaltung und Ankonzentrierung für ELISA-basierte Interaktionsstudien.

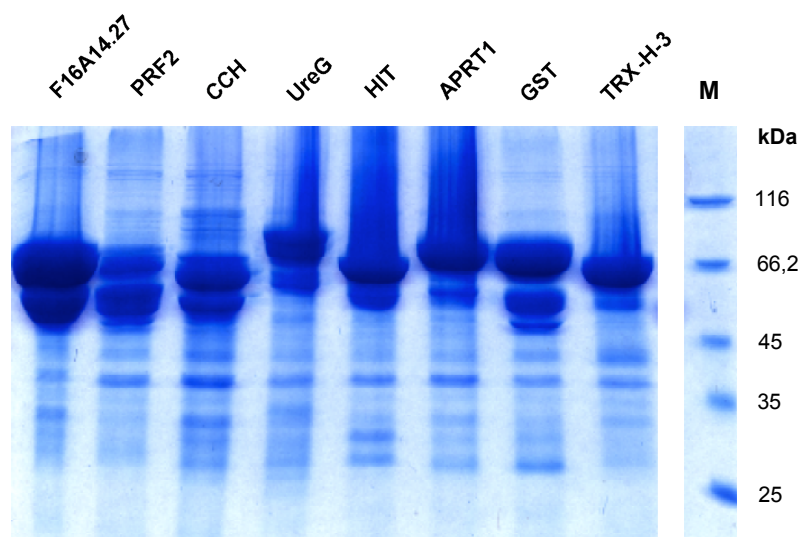


Abb. 2.24 Aufreinigung von *Intein*-Fusionen putativer Cnx1-Liganden. Es wurden jeweils 20 µl saturierte Chitinmatrix in 25 µl 1x Lp aufgenommen, auf ein 10 % SDS-PA-Gel aufgetragen und dieses Coomassie-gefärbt.

Anhand von **Abb. 2.24** wurde eine Konzentrationsabschätzung der Matrix-gebundenen *Intein*-Fusionen vorgenommen, um vergleichbare Protein-Mengen für *Pull Down*-Experimente einzusetzen.

Tab. 2.5 Für *Pull Down*-Experimente eingesetzte Mengen an *Intein*-Fusion putativer Cnx1-Liganden.

<i>Intein</i> -Fusion	Matrix-Volumen	<i>Intein</i> -Fusion	Matrix-Volumen
F16A14.27	2,5 µl	HIT	5 µl
PRF2	7,5 µl	APRT1	2,5 µl
CCH	5 µl	GST	2,5 µl
UreG	5 µl	TRX-H-3	2,5 µl

2.2.4.4 *Pull Down*-Experimente mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten

In einem ersten Ansatz von direkten Interaktionsstudien wurden die *Intein*-Fusionen der potentiellen Cnx1-Liganden entsprechend **Tab. 2.5** eingesetzt und mit jeweils 50 pmol rekombinantem Cnx1, Cnx1E bzw. Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ (*His-Tag*) co-inkubiert.

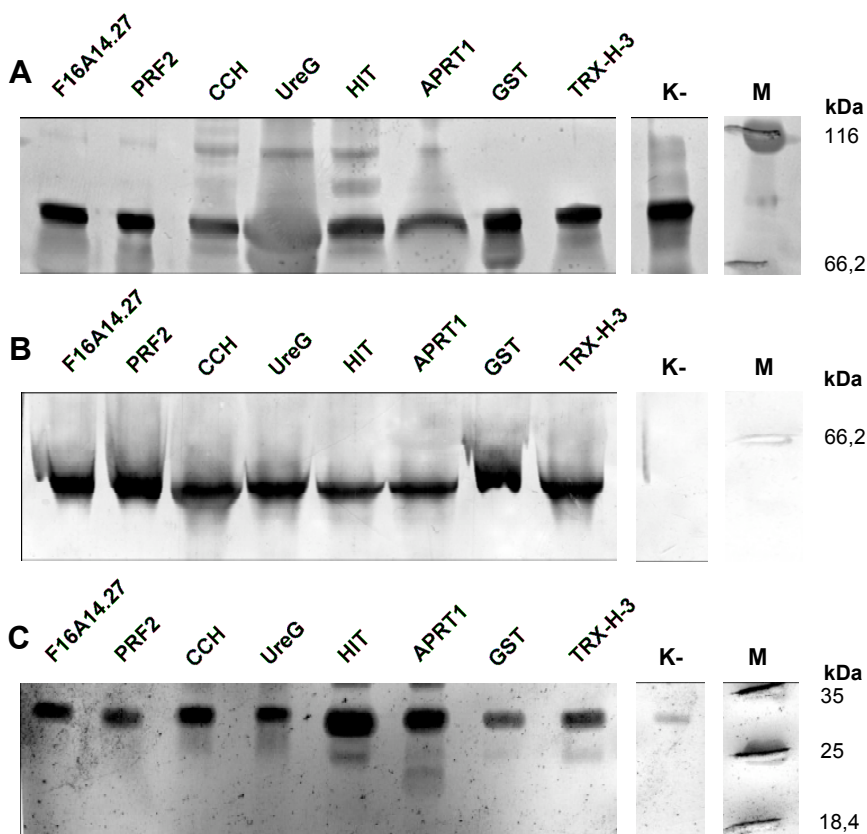


Abb. 2.25 Pull Down Assays mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten. Gezeigt sind Western-Blots von (A) Cnx1 (7,5 % SDS-PA-Gel), (B) Cnx1E (10 % SDS-PA-Gel) und (C) Cnx1G (15 % SDS-PA-Gel). Es sind jeweils die Spuren der acht *Intein*-Fusionen, die Negativkontrolle K- (5 µl ungekoppelte Chitin-Matrix) und der Marker dargestellt. Die Detektion erfolgte mit den Primär-Antikörpern 6B9 (Cnx1 und Cnx1E) bzw. 1B3 (Cnx1G), die in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt wurden.

Nach drei Waschschritten wurden die Pellets in 50 μ l 1x Lp aufgenommen. Jeweils 25 μ l wurden zur Bestimmung des Gehalts an co-sedimentierten Cnx1-Varianten mittels Western-Blot verwendet.

In **Abb. 2.25 A** sind für alle acht Ansätze Signale von co-sedimentiertem Cnx1 zu erkennen, wobei diese teilweise durch Überlagerung mit der jeweiligen *Intein*-Fusion (UreG, APRT1) verzerrt erscheinen, aber in ihrer Intensität keine signifikanten Unterschiede zeigen. Darüber hinaus weist auch die Negativkontrolle eine starke Cnx1-Bande auf. Da es also offensichtlich auch in Abwesenheit eines möglichen Liganden zur Sedimentierung von Cnx1 kam, waren aus diesem Experiment keine Rückschlüsse auf eventuelle Interaktionen zu ziehen. Im *Pull Down* mit Cnx1E (**Abb. 2.25 B**) konnte ebenfalls für alle potentiellen Interaktionspartner ein Signal festgestellt werden, nicht jedoch in der Negativkontrolle. Es ist allerdings als sehr unwahrscheinlich anzusehen, dass alle acht untersuchten Proteine in gleicher Weise an Cnx1E binden, zumal sich für Cnx1G (**Abb. 2.25 C**) ein ähnliches Resultat zeigte. Naheliegender ist eine unspezifische Wechselwirkung der Cnx1-Domänen, die durch die Anwesenheit des *Inteins* vermittelt wurde. Bezüglich der Kombinationen von HIT bzw. APRT1 mit Cnx1G konnte eine deutlich stärkere Bande beobachtet werden als bei den übrigen sechs Ansätzen. Ein Kontroll-Blot in Abwesenheit von Cnx1G ergab jedoch, dass es sich bei diesen Signalen um Kreuzreaktionen des Primär-Antikörpers mit Degradationsprodukten der *Intein*-Fusionen handelte (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend bleibt daher festzustellen, dass die *Pull Down*-Experimente der potentiellen Liganden mit rekombinant exprimierten Cnx1-Varianten keine Hinweise auf tatsächliche Interaktionen erbringen konnten.

2.2.4.5 *Pull Down*-Experimente mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *A. thaliana* Proteinrohextrakt

Die *Intein*-Fusionen der potentiellen Cnx1-Liganden wurden auch dazu verwendet, Versuche zum *Pull Down* von nativem Cnx1 aus *A. thaliana* Proteinrohextrakt zu unternehmen. Die Matrix-gekoppelten *Intein*-Varianten wurden entsprechend **Tab. 2.5** eingesetzt und für 1 h mit jeweils 400 μ l Proteinrohextrakt co-inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Pellets in 50 μ l 1x Lp aufgenommen. Parallel dazu wurden auch entsprechende Matrix-Mengen an unbehandelten *Intein*-Fusionen mit 50 μ l 1x Lp versetzt, um diese als Negativkontrolle zu verwenden und Kreuzreaktionen des Primär-Antikörpers zuordnen zu können. Jeweils 25 μ l wurden zur Analyse mittels Western-Blot eingesetzt.

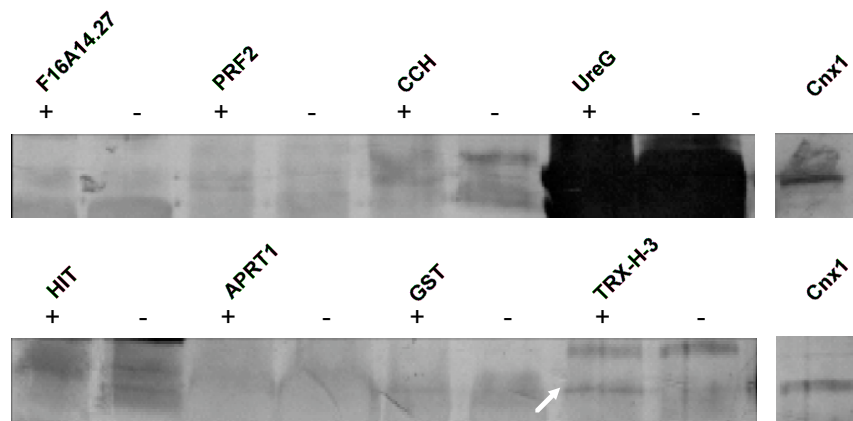


Abb. 2.26 Pull Down Assays mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *A. thaliana* Proteinrohextrakt. Es wurden jeweils *Pull Down*-Probe (+) und Negativkontrolle (-) sowie 20 μ l Rohextrakt (Cnx1) auf ein 7,5 % SDS-PA-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Cnx1-Primär-Antikörper (1:800).

Aus **Abb. 2.26** ist ersichtlich, dass im Falle des *Pull Downs* von TRX-H-3 eine definierte Bande (Pfeil) in der Höhe des Cnx1-Signals erscheint, die in der entsprechenden Negativkontrolle fehlt. Somit konnte ein erster Hinweis darauf gewonnen werden, dass ein im USPS Screen identifiziertes Protein (TRX-H-3) tatsächlich mit Cnx1 interagiert. Für den potentiellen Liganden UreG konnte keine Aussage getroffen werden, da der verwendete Primär-Antikörper die *Intein*-Fusion detektierte (komplette Hintergrundfärbung in den Spuren von *Pull Down* und Negativkontrolle). Hinsichtlich der übrigen sechs putativen Interaktionspartner war kein eindeutiges Cnx1-Signal zuzuordnen, da die Färbungen nur schwach ausfielen und es zudem teilweise auch in den Negativkontrollen zu Hintergrundreaktionen kam.

2.2.4.6 Pull Down-Experimente mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *in vitro*-translatiertem Cnx1

Die Verfügbarkeit der putativen Cnx1-Liganden in Form von Matrix-gekoppelten *Intein*-Fusionen wurde für *Pull Down*-Experimente mit *in vitro*-translatiertem Cnx1, Cnx1E und Cnx1G₄₄₁₋₆₇₀ genutzt. Zu diesem Zweck wurden die pcDNA3-Konstrukte der Cnx1-Varianten in 90 μ l Translationsansätzen durch Inkorporation von [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Nach erfolgter Translation wurden die Proben mit Waschpuffer auf 400 μ l aufgefüllt, mittels Nick-Säulen von verbliebener freier Radioaktivität getrennt und anschliessend auf die entsprechend **Tab. 2.5** vorgelegten *Intein*-Konstrukte sowie eine Negativkontrolle (5 μ l ungekoppelte Chitin-Matrix) aliquotiert. Im Anschluss an Co-Inkubation (1 h) und sechs Waschschrte wurden die Pellets in 25 μ l 1x Lp aufgenommen und diese zur Detektion gebundenen *in vitro*-Translats durch Autoradiographie eingesetzt.

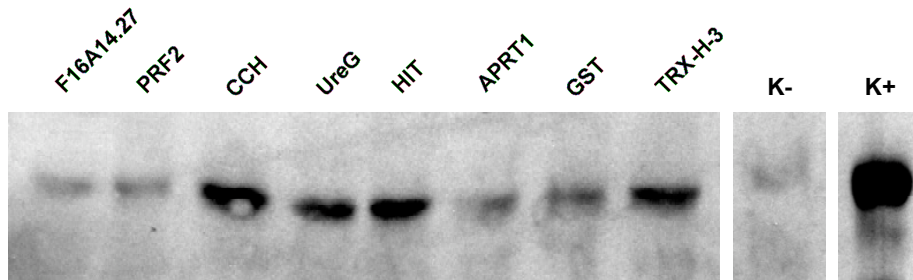


Abb. 2.27 Pull Down Assays mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *in vitro*-translatiertem Cnx1. Es sind die Spuren der acht *Intein*-Fusionen, die Negativkontrolle K- (5 μ l ungekoppelte Chitin-Matrix) und die Positivkontrolle K+ (3 μ l des Translationsansatzes) gezeigt. Es wurde ein 7,5 % SDS-PA-Gel verwendet und zur Auswertung mittels Autoradiographie eingesetzt.

Aus **Abb. 2.27** geht hervor, dass sich im *Pull Down* für vier der potentiellen Liganden deutliche Cnx1-Signale ergaben. Dabei handelte es sich um CCH, UreG, HIT und TRX-H-3. Anders als bei Verwendung von rekombinantem Cnx1 (2.2.4.4) liess sich durch den Einsatz von *in vitro*-translatiertem Protein also eine Differenzierung in der Cnx1-Bindung der möglichen Interaktionspartner erkennen, wobei die Signale für die vier genannten Proteine signifikant erscheinen.

2.2.4.7 Pull Down-Experimente mit Cnx1-*Intein* und *in vitro*-translatierten potentiellen Liganden

Anhand der *Pull Down*-Experimente auf der Basis von *Intein*-Fusionen der möglichen Interaktionspartner konnten weitere biochemische Hinweise auf Cnx1-Wechselwirkungen gewonnen werden. Die Kopplung von Proteinen an ein *Intein* als Affinitäts-Tag birgt jedoch im Zusammenhang mit Interaktionsstudien das Risiko, dass mögliche Bindungsstellen blockiert werden, zumal das durch die pTYB-Vektoren codierte *Sce* VMA-*Intein* mit 519 AS deutlich grösser ist als die daran fusionierten potentiellen Cnx1-Liganden. Um solche Interferenzen auszuschliessen, wurden die cDNA's der möglichen Interaktionspartner in den pGADT7-Vektor kloniert, um die Proteine *in vitro* ohne Anhang weiterer AS translatieren zu können (**Abb. 2.28**). Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen codierenden Sequenzen durch PCR-Mutagenese mit *Nde*I- bzw. *Xma*I-Restriktions-schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende versehen. Das Konstrukt pGADT7-PRF2 war schon aus 2.1.3.2 verfügbar, da jedoch *in vitro* kein Translat detektierbar war, konnte es für entsprechende Versuche nicht verwendet werden.

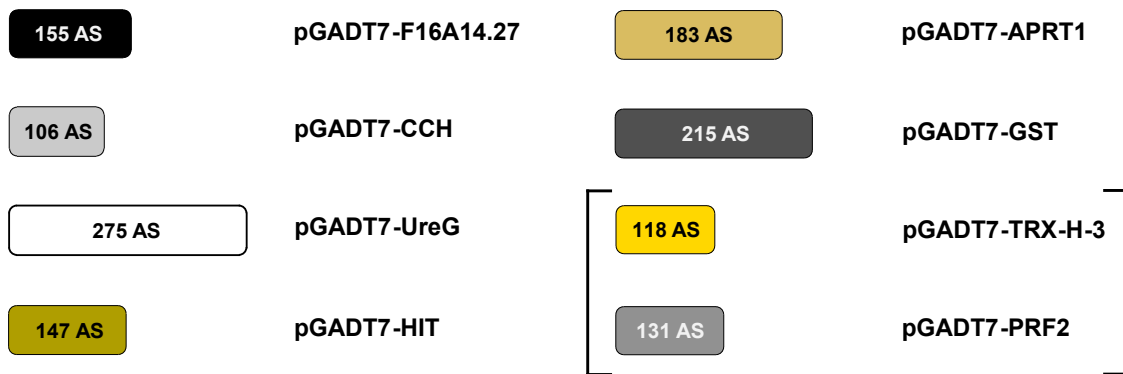


Abb. 2.28 Schema der pGADT7-Konstrukte potentieller Cnx1-Liganden. Angegeben ist die Kurzbezeichnung der Konstrukte in Verbindung mit der jeweiligen Protein-Grösse (Anzahl der Aminosäuren). Die Konstrukte pGADT7-PRF2 (2.1.3.2) und pGADT7-TRX-H-3 wurden kloniert, erzeugten aber *in vitro* kein Translat und sind daher in Klammern gesetzt.

Die pGADT7-Konstrukte der potentiellen Liganden wurden zur *in vitro*-Translation in 25 µl-Ansätzen eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Waschpuffer auf 400 µl aufgefüllt und mittels Nick-Säulen von verbliebener freier Radioaktivität getrennt. Für *Pull Down* Assays konnte auf die bereits vorhandene Cnx1-*Intein*-Fusion zurückgegriffen werden. Die umgepufferten Translate wurden jeweils auf 10 µl mit Cnx1-*Intein* saturierte Chitinmatrix sowie 10 µl leere Chitin-Matrix aliquotiert, da für jedes Konstrukt eine separate Negativkontrolle erforderlich war. Im Anschluss an Co-Inkubation (1 h) und sechs Waschschrte wurden die Pellets in 25 µl 1x Lp aufgenommen und zur Analyse mittels Autoradiographie eingesetzt.

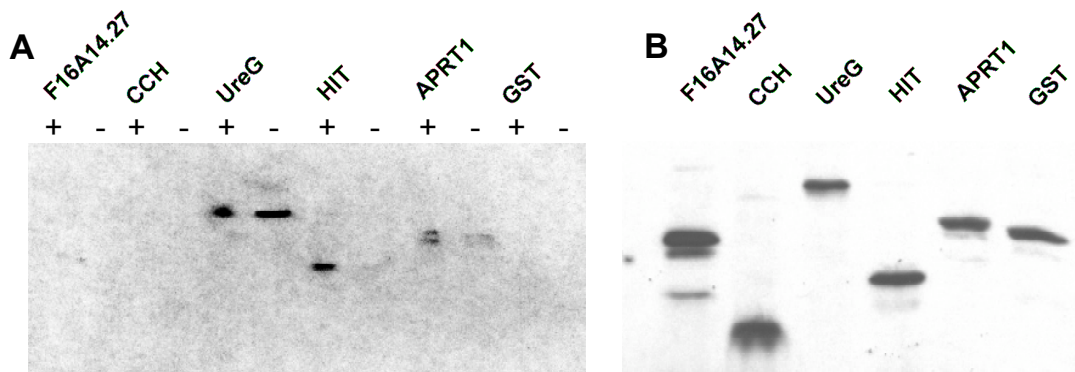


Abb. 2.29 Pull Down Assays von *in vitro*-translatierten potentiellen Liganden mit Cnx1-*Intein*. In (A) ist die Autoradiographie des jeweiligen *Pull Down*-Ansatzes (+) und der korrespondierenden Negativkontrolle (-) dargestellt. (B) zeigt das Kontrollgel der Translation (Auftrag jeweils 1,5 µl eines 25 µl Translationsansatzes). Es wurden jeweils 17 % SDS-PA-Gele verwendet.

Wie schon für pGADT7-PRF2 beobachtet, konnte auch für das Konstrukt pGADT7-TRX-H-3 keine Translation festgestellt werden. Hinsichtlich der verbleibenden sechs möglichen Cnx1-Interaktionspartner ergaben die Ansätze von F16A14.27, CCH und GST keine Co-Sedimentierung mit Cnx1-*Intein* (Abb. 2.29). Im Falle von UreG war zwar ein Signal zu erken-

nen, das aber in ähnlicher Intensität auch in der Negativkontrolle erschien und somit als unspezifisch eingestuft werden musste. Dagegen deuteten die Resultate von HIT und APRT1 erneut (vergl. **2.2.4.6**) auf eine Cnx1-Interaktion hin, da im *Pull Down* mit der Cnx1-Fusion Co-Sedimentierung eintrat, in der Negativkontrolle jedoch nicht (HIT) bzw. nur stark reduziert (APRT1).

2.2.4.8 ELISA-basierte Interaktionsstudien mit Cnx1 und potentiellen Liganden

In einem letzten Versuch zur Verifizierung der im USPS *Screen* identifizierten möglichen Cnx1-Interaktionspartner wurden die rekombinant exprimierten *Intein*-Fusionen der potentiellen Liganden für ELISA-Experimente mit Cnx1 bzw. Cnx1E verwendet. Zu diesem Zweck erfolgte eine Abspaltung von den 3 ml-Aliquots der jeweils mittels 2 l Expressionskultur saturierten Chitin-Matrix (**2.2.4.3**). Im Falle von PRF2, CCH und GST konnten dabei keine ausreichenden Proteinmengen gewonnen werden, da die Spaltungsreaktionen nur so unvollständig abliefen, dass nahezu die gesamte Proteinfraction als *Intein*-Fusion an der Matrix verblieb (kein Eluat detektierbar). Die Elutionsfraktionen der verbleibenden fünf möglichen Liganden wurden jeweils auf ein Volumen von 0,5 ml ankonzentriert (Ausbeuten s. **Tab. 2.6**)

Tab. 2.6 Ausbeuten an rekombinant exprimierten potentiellen Cnx1-Liganden nach *Intein*-Spaltung.

F16A14.27	UreG	HIT	APRT	TRX-H-3
1600 μ M/12,9 mg	724 μ M/10,9 mg	1891 μ M/15,1 mg	3776 μ M/37,3 mg	707 μ M/4,6 mg

Angegeben sind die für das jeweilige Protein gemessenen Konzentrationen (μ M, bezogen auf 0,5 ml Volumen) und erhaltenen Proteinmengen (mg) nach Abspaltung vom *Intein-Tag*, resultierend aus der Aufreinigung von 2 l Expressionskultur.

In zwei Ansätzen wurden auf ELISA-Platten pro *well* jeweils 200 pmol der putativen Liganden immobilisiert und mit 10-80 pmol Cnx1 bzw. Cnx1E überschichtet. Als Negativkontrollen wurden jeweils 50 pmol BSA immobilisiert und in gleicher Weise mit Cnx1 bzw. Cnx1E co-inkubiert. Unterschiede in der Durchführung beider Experimente betrafen lediglich die Positivkontrollen sowie die Konzentrationen des eingesetzten Primär-Antikörpers (**Abb. 2.30**).

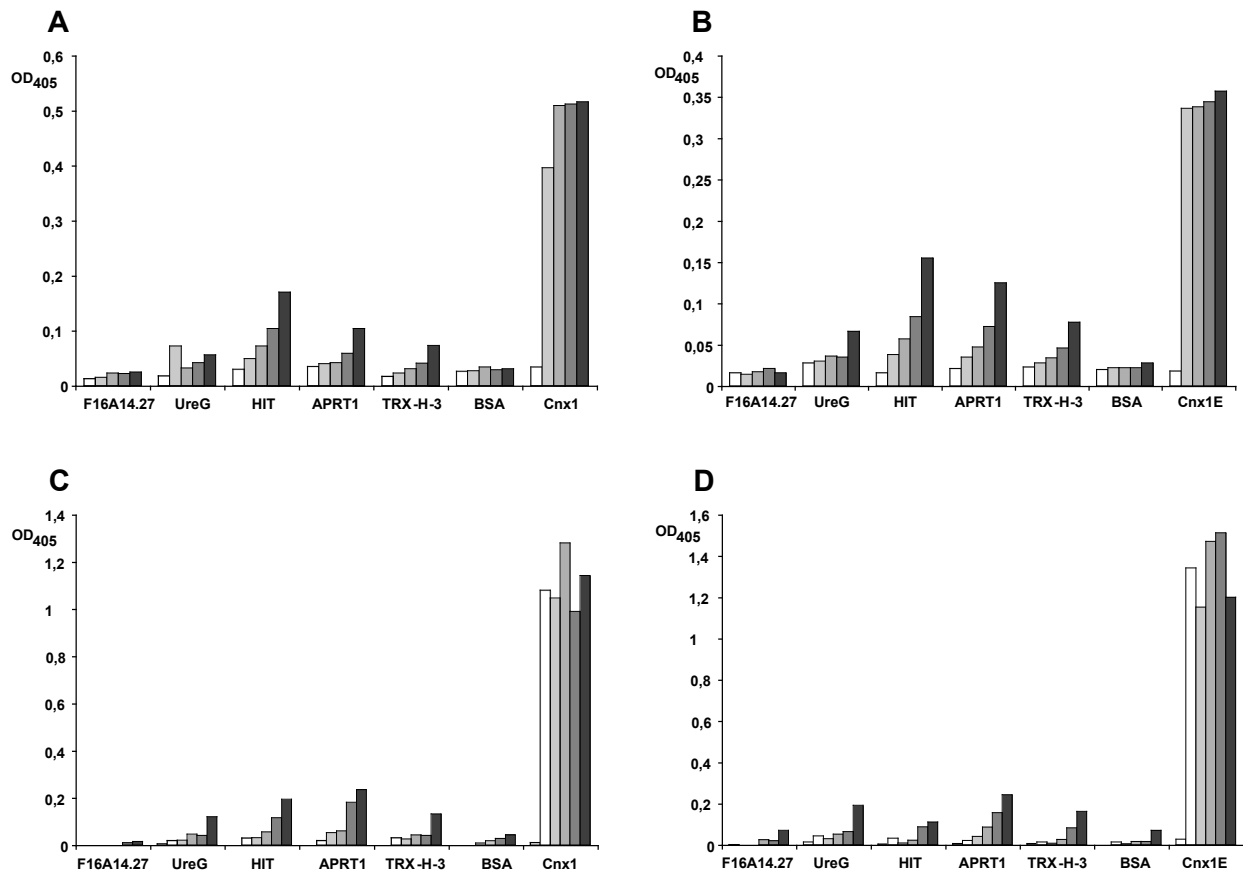


Abb. 2.30 ELISA-Ansätze von putativen Liganden und Cnx1 bzw. Cnx1E. Für jeden potentiellen Interaktionspartner (200 pmol immobilisiert) und BSA (50 pmol immobilisiert) sind (von links nach rechts) die Absorptionswerte bei Co-Inkubation mit 10, 20, 40 und 80 pmol Cnx1 (A/C) bzw. Cnx1E (B/D) angegeben. Als Positivkontrolle sind die Absorptionswerte von 10, 20, 40 und 80 pmol Cnx1/Cnx1E (A/B) bzw. 0, 1,25, 2,5, 5, 10 und 20 pmol Cnx1/Cnx1E (C/D) dargestellt. Der verwendete Primär-Antikörper (6B9) wurde in einer Konzentration von 1:250 bzw. 1:50 eingesetzt (A/B bzw. C/D).

Bei beiden ELISA-Ansätzen war für die potentiellen Interaktionspartner UreG, HIT, APRT1 und TRX-H-3 eine Steigerung der Absorptionswerte bei Erhöhung der Menge sowohl an co-inkubiertem Cnx1 als auch an Cnx1E festzustellen. Besonders eindeutig fielen die Daten hinsichtlich von HIT und APRT1 aus, jedoch lagen auch die für UreG und TRX-H-3 gemessenen Werte über denen der BSA-Reihe. Im Falle von F16A14.27 entsprachen die Absorptionsdaten der Negativkontrolle. Zwar wurden die ELISA-Versuche nicht unter gleichen Bedingungen wiederholt, so dass sich keine Fehlerabschätzung treffen liess, jedoch können die beiden Ansätze im Falle der vier erstgenannten Proteine als Indiz für eine Cnx1-Wechselwirkung gelten und geben darüber hinaus einen ersten Hinweis darauf, dass die E-Domäne entsprechende Interaktionen mit den Liganden vermittelt.

3. Diskussion

Cnx1 katalysiert in Form der Übertragung von Molybdän auf Molybdopterin den dritten Schritt der Moco-Biosynthese in *A. thaliana*. Das humane Homologe Gephyrin spielt als sog. *moon-lighting protein* neben seiner Funktion im Molybdän-Stoffwechsel auch eine wichtige Rolle bei der Koordination von Neurorezeptoren an der postsynaptischen Membran inhibitorischer Synapsen. Durch die Bindung an Mikrotubuli bildet Gephyrin eine Vernetzung mit dem Cytoskelett aus (Kirsch *et al.*, 1991) und ist darüber hinaus in weitere Protein-Interaktionen involviert. Aufgrund der Wechselwirkung mit Profilin (Giesemann *et al.*, 2003) und Collybistin (Kins *et al.*, 2000) ist Gephyrin mittelbar an dynamischen Vorgängen des Aktin-Systems beteiligt. Ferner bestehen durch die Interaktionen mit GABARAP (Kneussel *et al.*, 2000), RAFT1 (Sabatini *et al.*, 1999) und Dynein (Fuhrmann *et al.*, 2002) Verbindungen zu den Prozessen der Autophagocytose und der Translations-Regulation sowie zu Tubulin-abhängigen Transportmechanismen.

Angesichts der hochgradigen Homologie zwischen Cnx1 und Gephyrin erschien die Existenz unbekannter Interaktionspartner auch für die pflanzliche Molybdän-Insertase wahrscheinlich. In der Identifizierung möglicher Cnx1-bindender Proteine bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit.

3.1 Gezielte Cnx1-Interaktionstests

3.1.1 Profilin als potentielle Cnx1-Interaktionspartner

Profilin sind bei Eukaryoten ubiquitär verbreitete Proteine. Während die Sequenzhomologien von Profilinen verschiedener Spezies teilweise nur 25 % Prozent betragen, sind Struktur und Funktion hoch konserviert. Dabei zeichnen sich Profilin durch die Kombination dreier charakteristischer Eigenschaften aus: (1.) Sie bilden einen 1:1-Komplex mit G-Aktin, (2.) sie interagieren mit sauren Phospholipiden (PIP₂) und (3.) sie binden an Poly-Proline (Schlüter *et al.*, 1997). Profilin haben einen wichtigen Einfluss auf den Prozess der Aktinfilament-Assemblierung, indem sie einen polymerisationsfördernden Komplex mit Mg²⁺-ATP-G-Aktin (Profilaktin) ausbilden (Gutsche-Perelroizen *et al.*, 1999). Die Interaktion mit PIP₂ und Poly-Prolin integriert Profilin darüber hinaus in zahlreiche Signaltransduktions-Kaskaden wie den Rezeptor-Tyrosinkinase-Weg. Bei Säugern existieren vier Profilin-Isoformen (I, IIa, IIb und III), wobei die Varianten IIa und IIb durch alternatives *Splicing* eines primären Transkripts entstehen (Lambrechts *et al.*, 2000).

Durch Mammoto *et al.* (1998) wurde eine *in vitro*-Bindung des ubiquitär exprimierten Profilin I an Gephyrin gezeigt. Giesemann *et al.* (2003) konnten *in vitro* die Interaktion der Profilin I und IIa

mit Gephyrin sowie eine Co-Lokalisierung von Profilin und Gephyrin *in vivo* nachweisen. Dabei wurde die Profilin-Bindung auf die E-Domäne von Gephyrin eingegrenzt und damit die frühere Hypothese einer Interaktion mit der Prolin-reichen Zentraldomäne widerlegt. Gephyrin, G-Aktin und PIP₂ stehen in Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle auf Profilin und schliessen sich daher hinsichtlich einer Interaktion wechselseitig aus.

Angeichts der Identifizierung einer Profilin-Genfamilie bei *A. thaliana* durch Huang *et al.* (1996) waren pflanzliche Profiline auch als potentielle Interaktionspartner von Cnx1 interessant. Dies galt insbesondere nach Zuordnung der Profilin-Gephyrin-Interaktion auf die E-Domäne (die Prolin-reiche Linker-Region fehlt im Falle von Cnx1). Es konnten vier cDNA's von *A. thaliana* Profilinen (PRF1-PRF4) isoliert werden. Eine Expressionsanalyse der korrespondierenden Gene ergab, dass PRF1-PRF3 ubiquitär exprimiert werden, während PRF4 auf Pollen beschränkt ist (Huang *et al.*, 1996). Zur gleichen Zeit veröffentlichten auch Christensen *et al.* (1996) Studien bezüglich *A. thaliana* PRF1-PRF4. Sie beschrieben ebenso eine Unterteilung in konstitutiv exprimierte und Pollen-spezifische Profiline, ordneten allerdings abweichend nur PRF1 und PRF2 den konstitutiv exprimierten Genen zu. Es konnte die Bindung von PRF1 und PRF3 an Poly-L-Prolin gezeigt sowie durch die Komplementation von *S. cerevisiae*- und *S. pombe*-Mutanten mit *A. thaliana*-Profilinen die funktionelle Gleichwertigkeit von pflanzlichen und Hefe-Profilinen bewiesen werden.

Zur Untersuchung auf Cnx1-Interaktion wurden die cDNA's der beiden konstitutiv exprimierten *A. thaliana* Profiline 1 und 2 in verschiedene Vektoren kloniert. Nach rekombinanter Aufreinigung von PRF1 und PRF2 und Co-Inkubation mit Cnx1 konnte mittels Gelfiltration jedoch keine Komplexbildung zwischen den potentiellen Interaktionspartnern festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass eine starke Profilin-Cnx1-Wechselwirkung nicht vorliegt. Einen sensibleren Ansatz stellt dagegen der *Dot Overlay Assay* dar, weil die Nachweismethode anhand von Autoradiographie auch die Erkennung schwacher Signale zulässt. Nach Immobilisierung von PRF1 und PRF2 und Co-Inkubation mit Cnx1-Varianten waren allerdings keine Hinweise auf Interaktion festzustellen. Da das PRF2-Konstrukt *in vitro* kein Translat erzeugte, konnte mittels Umkehrung des *Dot Overlay Assays* (Immobilisierung von Cnx1-Varianten) nur hinsichtlich einer möglichen PRF1-Interaktion eine Aussage getroffen werden, wobei das Resultat auch in diesem Fall negativ ausfiel. Schliesslich wurde die Methode des GAL4 *Two Hybrid* angewendet, um eventuelle Wechselwirkungen zwischen PRF1/PRF2 und Cnx1 bzw. seinen separaten Domänen *in vivo* zu detektieren. Anhand der sich ergebenden Hefe-Phänotypen waren dabei für keine der Profilin-Cnx1-Kombinationen Anhaltspunkte zu erkennen, die auf eine Interaktion hindeuten könnten. Einzig im ELISA Assay zeigte sich für PRF1 eine reproduzierbare Korrelation zwischen der Menge an co-inkubiertem und dem Anteil an detektiertem und somit PRF1-gebundenem Cnx1. Bezüglich von PRF2 fiel das Ergebnis nicht signifikant aus, was möglicher-

weise auf die denaturierende Aufreinigung und eine unvollständige Rückfaltung in den nativen Zustand zurückzuführen war.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass zwar anhand der ELISA-Daten ein Hinweis für eine mögliche Interaktion zwischen pflanzlichen Profilinen und Cnx1 erhalten wurde, dieses Resultat aber durch die Ergebnisse der übrigen Versuche nicht untermauert und daher ein Beweis nicht erbracht werden konnte. Somit muss die Frage der Übertragbarkeit der Profilin-Gephyrin-Wechselwirkung auf das pflanzliche System offen bleiben. Ebenso spekulativ ist auch die eventuelle Funktion einer Cnx1-Interaktion mit Profilinen. Diese könnte in einer nicht näher zu präzisierenden Regulation der Aktin-Assemblierung bestehen, so dass aufgrund der Cnx1-Bindung an F-Aktin wiederum ein Einfluss auf die Cytoskelett-Assoziierung der pflanzlichen Molybdän-Insertase möglich wäre, sollte Cnx1 in Gephyrin-analoger Weise mit G-Aktin und PIP₂ in Konkurrenz um eine Profilin-Interaktion stehen.

3.1.2 Untersuchung GABARAP-homologer Proteine auf Interaktion mit Cnx1

Das APG8/Aut7-Protein (14 kDa) aus *S. cerevisiae* ist ein zentraler Schalter im Prozess der Autophagocytose. In Eukaryoten gibt es zwei unterschiedliche Systeme, die für einen Grossteil der Degradation von Makromolekülen verantwortlich sind. Der eine Weg besteht im Proteasomen-vermittelten Abbau von Ubiquitin-markierten Proteinen. Beim Prozess der Autophagocytose können dagegen nicht nur einzelne Proteine, sondern auch grössere zelluläre Komponenten bis hin zu Organellen abgebaut werden (Kopitz *et al.*, 1990, Review in Wang & Klionsky, 2003). Autophagocytose tritt in allen eukaryotischen Zellen auf, ist aber unter normalen Wachstumsbedingungen auf ein basales Niveau reduziert. Hingegen kommt es bei Nährstoffmangel oder Einwirkung von Stress zu einer Induktion dieses Degradationsprozesses. Der Vorgang wird eingeleitet, indem der letzte C-terminale AS-Rest des APG8-Proteins durch eine Protease (APG4) entfernt wird, wodurch ein hoch konservierter Glycin-Rest den neuen C-Terminus bildet (Kirisako *et al.*, 2000). Anschliessend kommt es in einem der Ubiquitin-Aktivierung ähnlichen Prozess zunächst zur Adenylierung und Übertragung von APG8 auf ein E1-Protein (APG7), wobei die Verknüpfung durch Ausbildung eines Thioesters zustande kommt. Nach Transfer auf ein E2-Enzym (APG3) erfolgt die Anheftung eines Lipids (Phosphatidylethanolamin, PE), das durch eine Amid-Bindung mit dem C-terminalen Glycin von APG8 verbunden wird und dem Protein als Membran-Anker dient (Ichimura *et al.*, 2000). Das APG8-PE-Konjugat vermittelt über einen noch nicht vollständig verstandenen Prozess die Bildung von Autophagosomen genannten Strukturen, indem zu degradierende Substrate von einer Doppelmembran-Hülle eingeschlossen und nachfolgend einem lytischen Organell (Lysosom bzw. Vakuole) zugeführt werden.

Das Protein GABARAP wurde ursprünglich als Ligand des GABA-Rezeptors in humanen Neuronen beschrieben (Wang *et al.*, 1999). Dabei konnte die Bindungsstelle von GABARAP auf den intrazellulären Loop der $\gamma 2$ -Untereinheit des Rezeptors eingegrenzt werden, darüber hinaus wurde auch die Homologie zum Mikrotubuli-bindenden Protein MAP1-LC3 erkannt. Nachfolgend konnte anhand von GAL4 *Two Hybrid Assays* die Interaktion von GABARAP mit Gephyrin identifiziert werden (Kneussel *et al.*, 2000).

Nach der Entdeckung einer APG8-homologen Genfamilie bei *A. thaliana* (Doelling *et al.*, 2002, Hanaoka *et al.*, 2002) waren die pflanzlichen APG8-Proteine vor dem Hintergrund der GABARAP-Gephyrin-Wechselwirkung als mögliche Cnx1-Interaktionspartner zu betrachten. Da auch *A. thaliana* APG8-Proteine an Mikrotubuli binden und entsprechende Hefe-Mutanten komplementieren, konnte deren Beteiligung an der Autophagocytose bewiesen werden (Ketelaar *et al.*, 2004). Jüngst wurde in pflanzlichen Zellen durch Verwendung von APG8-GFP-Konstrukten die Bildung von Autophagosomen und deren Transport in die Vakuole visualisiert (Yoshimoto *et al.*, 2004, Contento *et al.*, 2005).

Unter den neun aufgrund ihrer Homologie zu GABARAP für Interaktionstests mit Cnx1 in Frage kommenden Proteinen (APG8a-i) wurden zunächst APG8h und APG8i rekombinant aufgereinigt. Diese beiden Proteine bilden innerhalb der pflanzlichen APG8-Homologen eine Subgruppe mit geringerer Sequenzübereinstimmung in Bezug auf GABARAP, es gab jedoch durch einen früheren GAL4 *Two Hybrid Screen* (Lindecke, 1999) einen Hinweis auf APG8i als möglichen Interaktionspartner von Cnx1. Wie schon im Falle der auf Cnx1-Wechselwirkung getesteten Profilinen konnte mittels Gelfiltration keine Ausbildung eines Komplexes zwischen APG8h/APG8i und Cnx1 bzw. seinen Domänen beobachtet werden. Dagegen waren im *Dot Overlay Assay* bei Immobilisierung von rekombinantem Cnx1 für beide APG8-Proteine Anhaltspunkte zu erkennen, die auf Interaktion hindeuten. Die Signale wurden sowohl für Cnx1 als auch Cnx1E erhalten, nicht dagegen für Cnx1G und fielen hinsichtlich von APG8i wesentlich stärker aus. Es könnte somit eine Wechselwirkung von APG8h und APG8i mit der E-Domäne von Cnx1 vorliegen. Zur möglichen Bestätigung wurden weitere Experimente *in vitro* bzw. *in vivo* vorgenommen. Dabei konnte im *Dot Overlay Assay* für *in vitro*-translatierte Cnx1-Varianten keine Bindung an APG8h oder APG8i festgestellt werden. Dieses Resultat steht somit im Widerspruch zum vorherigen Ergebnis. Aufgrund der starken unspezifischen Membranbindung der markierten Cnx1-Translate ist es aber möglich, dass Interaktionssignale wegen einer Überlagerung durch Hintergrundfärbung nicht erkannt werden konnten.

Nachfolgende Experimente schlossen die restlichen sieben *A. thaliana* APG8-Proteine ein. Bei *Pull Down Assays* konnte eine Co-Sedimentierung von APG8g, h und i mit Cnx1 beobachtet werden. Durch dieses Ergebnis wurden die Hinweise auf APG8h und i bezüglich Cnx1-Interaktion verstärkt; der Kreis der vielversprechenden Kandidaten konnte darüber hinaus um

APG8g erweitert werden, das im Zuge der vorherigen Experimente zunächst nicht untersucht worden war.

Eine abschliessende Bewertung der bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Anhaltspunkte für eine mögliche APG8-Cnx1-Wechselwirkung in Pflanzen sollte mittels GAL4 *Two Hybrid* erfolgen. Dabei ergab sich für keines der APG8 *full length*-Konstrukte eine Cnx1-Interaktion. Ein Grund dafür könnte in der Tubulin-Bindung der APG8-Proteine liegen, da eine Assoziation mit dem Cytoskelett deren Verbleib im Cytoplasma von *S. cerevisiae* bedingen dürfte. Für diese Hypothese würde auch die Beobachtung von Kneussel *et al.* (2000) sprechen, dass GABARAP *full length* im GAL4 *Two Hybrid* keine Interaktion mit Gephyrin zeigte. Dagegen resultierte die Verwendung von GABARAP 37-117 in einer Reporter-gen-Aktivierung. Im Vergleich zum nativen Protein fehlt diesem N-terminalen Deletionskonstrukt das Tubulin-Bindungsmotiv der AS 1-36, das offenbar den Kernimport von GABARAP verhindert. Um ein ähnliches Phänomen bei der Untersuchung der pflanzlichen APG8-Proteine bezüglich Cnx1-Interaktion auszuschliessen, wurden in Analogie zu GABARAP 37-117 die Konstrukte APG8 $\Delta 36$ erstellt. Zwar konnte nach Co-Transformation mit den Cnx1-Varianten die Gegenwart der APG8-Fusionen im Hefe-Zellkern abgeleitet werden, eine Wechselwirkung wurde aber nicht angezeigt. Das entsprechende Resultat wurde auch bei Verwendung der APG8 $\Delta 36$ GV-Konstrukte erzielt. Diesen APG8-Varianten fehlt neben der Fähigkeit zur Tubulin-Bindung auch die Möglichkeit, in Hefezellen die PE-Konjugation zu durchlaufen, da der hierfür essentielle Glycin-Rest durch einen Valin-Rest ersetzt wurde. Eine Verknüpfung mit dem „Membrananker“ PE dürfte die modifizierte APG8-Fraktion im Cytoplasma zurückhalten und dadurch die GAL4-Signalgebung auch bei Aufhebung der Tubulin-Bindung erschweren. Da die *in vivo*-Interaktionstests mit Cnx1 jedoch trotz Blockierung der APG8-Membranbindungsfunktion negativ ausfielen, konnte eine cytoplasmatische Retention der potentiellen Liganden als Ursache ausgeschlossen werden.

Das Fazit aus den Interaktionsstudien zwischen Cnx1 und APG8-Proteinen fällt zweigeteilt aus. *In vitro* vorgenommene Experimente ergaben Hinweise darauf, dass APG8g, h und i an Cnx1 binden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag aber auf GAL4 *Two Hybrid* Assays. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die Interaktion zwischen Gephyrin und GABARAP zwar mittels GAL4 *Two Hybrid* identifiziert wurde (Kneussel *et al.*, 2000), es jedoch im Falle beider Proteine nur bei Verwendung von Deletionskonstrukten (Gephyrin 153-348; GABARAP 37-117) zur Detektion der Wechselwirkung kam. Hinsichtlich der pflanzlichen APG8-Proteine wurde diesem Resultat in Form der Varianten APG8 $\Delta 36$ bzw. APG8 $\Delta 36$ GV Rechnung getragen. Das deletierte Konstrukt Gephyrin 153-348 ist jedoch nicht unmittelbar auf Cnx1 zu übertragen, da es neben einem C-terminalen Abschnitt der G-Domäne (Helix $\alpha 6$) und N-terminalen Bereichen der E-Domäne die zentrale Prolin-reiche Linker-Region enthält, die Cnx1 fehlt. Das könnte zum einen bedeuten, dass die Bindung von GABARAP an Gephyrin kein Äquivalent im

pflanzlichen System besitzt und es sich bei den *in vitro*-Ergebnissen um Artefakte handelt. Da aber auch die erwähnten Anteile von G- und E-Domäne für eine entsprechende Interaktion in Frage kommen, ist eine APG8-Cnx1-Wechselwirkung prinzipiell möglich, konnte aber *in vivo* (GAL4 *Two Hybrid*) nicht nachvollzogen werden. Es ist daher ohne weitere Versuchsansätze nicht abschliessend zu klären, ob es unter den pflanzlichen APG8-Proteinen tatsächlich zur Bindung an Cnx1 kommt. Sollten zukünftige Experimente eine solche Interaktion bestätigen, bliebe die Frage nach einer möglichen Funktion. Für das humane System wurde postuliert, dass GABARAP durch Wechselwirkung mit Mikrotubuli den Vesikel-Transport von GABA-Rezeptoren und ggf. assoziiertem Gephyrin vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran vermittelt (Kneussel *et al.*, 2000). Ob pflanzliche APG8-Proteine, insbesondere die für eine Cnx1-Bindung in Frage kommenden APG8g, h und i, ebenfalls an Transmembran-Proteine binden, ist ungeklärt, so dass es für eine Übertragbarkeit der putativen GABARAP-Funktion (derzeit selbst rein hypothetisch) auf die Verhältnisse in *A. thaliana* keinerlei Anhaltspunkte gibt.

3.1.3 Weitere gezielte Interaktionstests mit Cnx1

Neben den pflanzlichen Profilinen und APG8-Proteinen wurden weitere potentielle Interaktionspartner hinsichtlich einer möglichen Cnx1-Bindung untersucht. Für die Proteine Cnx6 und Cnx7 (grosse bzw. kleine Untereinheit der MPT-Synthase) war eine solche Wechselwirkung postuliert worden (Schwarz *et al.*, 2000), da sie im Zuge des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese (Katalyse der MPT-Bildung) das Substrat für die Cnx1-Reaktion (Insertion des Molybdäns) zur Verfügung stellen. Ein direkter Übergang des MPT's würde dabei die Wahrscheinlichkeit einer Oxidation verringern, jedoch konnte bislang weder im bakteriellen noch im eukaryotischen System eine Interaktion der MPT-Synthase mit den Proteinen des dritten Schritts der Moco-Biosynthese demonstriert werden. Zur Detektion einer möglichen Wechselwirkung wurden Cnx6 bzw. Cnx6/Cnx7 mittels *Dot Overlay Assays* auf Cnx1-Bindung untersucht, das Ergebnis fiel jedoch negativ aus. Angesichts dieses ersten Resultats wurde auf weitere Experimente verzichtet, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion vorliegt und ein Nachweis mit alternativen Versuchsansätzen möglich ist. So konnten durch Co-Lokalisierungsexperimente unter Verwendung von *N. tabacum*-Suspensionszellen Anhaltspunkte für eine Wechselwirkung zwischen Cnx1 und Cnx6 erhalten werden (Nowak, 2004).

Ebenfalls untersucht wurde eine mögliche Cnx1-Interaktion des putativen ribosomalen Proteins L12, das mittels GAL4 *Two Hybrid Screen* identifiziert worden war (Lindecke, 1999). Bei der damaligen Auswertung war von einer Lokalisierung in den Chloroplasten ausgegangen worden, eine neuerliche Datenbank-Analyse ergab jedoch, dass es sich um das L12-Protein (AAM65708) der 60S-Untereinheit der cytoplasmatischen Ribosomen handelt, so dass eine

Wechselwirkung mit dem ebenfalls cytoplasmatisch lokalisierten Cnx1 denkbar wäre. Die Hypothese einer Verbindung zwischen der Protein-Translationsmaschinerie und dem dritten Schritt der Moco-Biosynthese wäre hoch spekulativ. Im humanen System ist in Form der Interaktion von Gephyrin mit RAFT1 (Sabatini *et al.*, 1999) ein mittelbarer Zusammenhang nachgewiesen, da RAFT1 durch Phosphorylierung der p70 ribosomalen Kinase S6 einen Einfluss auf die Translationsregulation besitzt. Die bei den Interaktionstests mit L12 erhaltenen Resultate sprechen aber für eine unspezifische Cnx1-Bindung, da diese sowohl E- und G-Domäne als auch die verwendeten Subdomänen-Konstrukte betraf. Weitere Experimente wurden daher nicht unternommen.

3.2 USPS *Two Hybrid Screens* nach Cnx1-Interaktionspartnern

Zur Suche nach neuen Interaktionspartnern des Cnx1-Proteins wurde die Technik des USPS *Two Hybrid Screens* angewendet. Bei cytosolisch lokalisierten Proteinen kann ein Transfer in den Hefe-Zellkern erschwert oder sogar ausgeschlossen sein, was die erfolgreiche Durchführung eines *in vivo*-Assays nach dem Prinzip der Transkriptionsfaktor-Rekonstitution u. U. ausschliesst. Sind *Bait*- oder *Prey*-Fusion mit Elementen des Cytoskeletts assoziiert, ist ein Ausbleiben der Signalkaskade aufgrund der cytoplasmatischen Retention wahrscheinlich. Damit erscheint Cnx1 aufgrund seiner Bindung an Aktinfilamente (Schwarz *et al.*, 2000) als *Bait* im GAL4 *Two Hybrid Assay* fragwürdig, und ein entsprechender Versuchsansatz (Lindecke, 1999) führte nicht zu einer Identifizierung von Proteinen, die nach Durchlaufen aller Kontrollen als echte Interaktionspartner betrachtet werden konnten. Auch im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich anhand der APG8-Proteine bereits ein Beispiel für eine entsprechende Problematik, da diese erst nach Deletion der Tubulin-Bindungsstelle in den Hefe-Zellkern gelangen konnten. Darüber hinaus wurde für Cnx1 die Interaktion mit einem hypothetischen Molybdat-Transporter postuliert (Schwarz *et al.*, 2000), was auch die Lokalisierung des Proteins unterhalb der Plasmamembran erklären würde (Nowak, 2004). Während mit den Proteinen des *mod*-Operons bei *E. coli* ein hochaffines System zur Aufnahme von Molybdän beschrieben wurde (Rech *et al.*, 1995), ist die eukaryotische Molybdataufnahme noch ungeklärt. Es ist sowohl die Existenz eines spezifischen Molybdat-Transporters denkbar, das Molybdat könnte aber auch durch einen weniger spezifischen Anionen-Carrier wie z. B. einen Sulfat-Transporter in die Zelle gelangen. Sollte Cnx1 tatsächlich mit einem Transmembran-Protein interagieren und auf diese Weise die Molybdän-Insertion im dritten Schritt der Moco-Biosynthese mit der zellulären Molybdat-Aufnahme koppeln, wäre die Technik des GAL4 *Two Hybrid Assays* zur Identifizierung dieser Wechselwirkung ebenfalls ungeeignet.

USPS *Two Hybrid Assays* basieren grundsätzlich auf der durch Ubiquitin-Reassemblierung vermittelten Freisetzung eines Reporter-Proteins (4.4.1.2.). Zur Zeit sind mehrere USPS-Systeme verfügbar, die sich allerdings in der Art des verwendeten Reporters unterscheiden. Dabei kann es sich zum einen um einen Transkriptionsfaktor handeln, der nach Abspaltung von der *Bait*-Fusion in den Zellkern importiert wird und nachfolgend die Aktivierung von Reporter-Genen vermittelt (Dual Membrane Kit, Dual Systems). Dieses Detektionsprinzip setzt jedoch voraus, dass das *Bait*-Konstrukt sicher ausserhalb des Zellkerns verankert ist, da es ansonsten aufgrund des Kernlokalisierungssignals der Transkriptionsfaktor-Domäne zu einem Kernimport der gesamten *Bait*-Fusion kommt. Somit stellt der Dual Membrane Kit quasi eine Umkehrung der Limitierung des GAL4 *Two Hybrid* dar. Dagegen erlaubt die Verwendung des URA3-Proteins als Reporter und dessen proteolytische Degradation im Falle einer Interaktion theoretisch sowohl nukleäre als auch cytoplasmatische Lokalisierung des *Bait*-Konstruktes, so dass diese Technik die Detektion von Wechselwirkungen mit Transmembran-Proteinen ermöglicht (Wittke *et al.*, 1999, Wittke *et al.*, 2000), aber nicht auf diese beschränkt ist.

3.2.1 Durchführung der USPS *Two Hybrid Screens*

Vor dem Einsatz der Cnx1-URA3-Fusion im Zuge dieser Arbeit war noch kein USPS *Two Hybrid Screen* auf der Basis eines cytoplasmatisch lokalisierten *Bait*-Proteins durchgeführt worden. Es wurden daher zunächst eingehende Tests unternommen, um die Rahmenbedingungen für das *Screening* einer cDNA-Bank mittels Cnx1-*Bait* zu bestimmen. Dabei konnte sowohl die stabile Expression von Cnx1-C_{ub}-R-URA3 als auch die Funktionalität des URA3-Reporters innerhalb der *Bait*-Fusion belegt werden.

Zur Durchführung eines ersten USPS *Screens* ohne Induktion der *Prey*-Expression wurde die Technik der beschleunigten Plasmidisolierung entwickelt. Bei einer relativ geringen Transformationseffizienz (80000 Klone) offenbarte sich das Problem der Isolation zahlreicher *Prey*-Vektoren mit einem frühen Stop-Codon (54 von 63 positiven Klonen) und offensichtlich mutierter *Bait*-Fusion. Für einen neuerlichen *Screen* wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, neben einer höheren Transformationsrate auch eine schnelle Identifikation von falsch positiven Klonen zu erreichen. Zu diesem Zweck erfolgte nach sequentieller Transformation zunächst eine Induktion der *Prey*-Expression, um dann in einem zweiten Schritt durch Analyse des Wachstums unter nicht induzierenden Bedingungen zwischen *Prey*-abhängigen Interaktionen oder aber mutierten *Bait*-Konstrukten zu unterscheiden. Bei einer hohen Transformationseffizienz von 2,5 Mio. Klonen konnten 324 positive Klone identifiziert werden, die mittels *Yeast Colony PCR* und RFLP-Analyse charakterisiert wurden. Die Tatsache, dass Klone in zahlreichen Fällen wiederholt auftraten, sprach gegen eine rein statistische Verteilung und konnte somit als erstes

Indiz dafür gewertet werden, dass im Zuge dieses *Screens* in der Tat Interaktionspartner von Cnx1 identifiziert worden waren. Darüber hinaus konnten in Form von CCH und PRF2 zwei Proteine detektiert werden, für die aufgrund ihrer Funktion bzw. der Homologie zu einem bekannten Gephyrin-bindenden Protein eine Cnx1-Interaktion (vorbehaltlich noch zu führender biochemischer Nachweise) besonders wahrscheinlich erschien.

3.2.2 Auswertung der USPS-Ergebnisse

Bei der Auswertung der identifizierten cDNA-Klone (**Tab. 2.3/2.4**) fiel auf, dass sich keine Proteine aus der Moco-Biosynthese wie etwa Cnx6/Cnx7 oder ABA3 darunter befanden, obwohl diese das Substrat der Cnx1-Reaktion (MPT) zur Verfügung stellen bzw. einen Teil des synthetisierten Moco's zur Sulfurierung übernehmen. Ebenso wurden keine Molybdoenzyme als potentielle Cnx1-Interaktionspartner detektiert. Im Falle der Dioxo-Mo-Hydroxylasen, die keine Cofaktor-Sulfurierung benötigen, könnte ein direkter Übergang des Moco's von der Molybdän-Insertase postuliert werden, sofern keine intermediäre Bindung an ein (hypothetisches) Moco-Carrierprotein erfolgt. Möglicherweise existiert also keine Interaktion von Proteinen der Moco-Biosynthese bzw. Molybdoenzymen mit Cnx1, es ist aber auch denkbar, dass eine entsprechende Wechselwirkung die Gegenwart von MPT bzw. Moco erfordert, um beispielsweise Konformationsänderungen der beteiligten Proteine zu vermitteln. So konnten Interaktionen zwischen den *E. coli*-Proteinen MogA und MoeA bzw. MoeA und MobA *in vivo* nur in Gegenwart von MPT detektiert werden (Magalon *et al.*, 2002). Sollte auch Cnx1 MPT-/Moco-abhängige Wechselwirkungen eingehen, wäre eine Identifizierung mittels *Yeast Two Hybrid* nicht möglich, da *S. cerevisiae* als einziger bekannter Organismus keine Moco-Biosynthese betreibt.

Ein wesentlicher Grund zum *Screening* einer cDNA-Bank mittels der USPS-Methode war die mögliche Bindung von Cnx1 an ein Transmembran-Protein, wobei es sich eventuell um den postulierten Molybdat-Transporter handeln könnte. Unter den als positiv identifizierten Klonen konnte jedoch keine cDNA ausgemacht werden, die für ein putatives Transmembran-Protein codiert, so dass die Frage nach einer solchen Cnx1-Interaktion offen bleiben muss. Im Zusammenhang mit einer USPS-Detektion von Wechselwirkungen unter Einschluss von Transmembran-Proteinen gilt es jedoch zu bedenken, dass die Lokalisierung der N_{ub}-Domäne am *Prey*-Konstrukt von entscheidender Bedeutung ist. Da sich der für die N_{ub}-Domäne codierende Bereich am 5'-Ende des cDNA-Inserts befindet, können anhand dieser Konfiguration nur Interaktionen mit solchen Transmembran-Proteinen identifiziert werden, deren N-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert ist. Es wäre daher trotz des aktuell negativen Ergebnisses möglich, dass ein USPS *Screen* auf der Basis von C-terminalen N_{ub}-*Prey*-Fusionen zur Detektion eines mit Cnx1 interagierenden Transmembran-Proteins führt.

Zur Verifizierung der potentiellen Cnx1-Interaktionspartner wurden verschiedene Versuchsansätze *in vivo* bzw. *in vitro* unternommen, dazu zählten neben Experimenten zur Co-Lokalisierung in humanen Zellen und *Pull Down Assays* auch ELISA-basierte Untersuchungen. In einigen Fällen kam es zu grundlegenden Schwierigkeiten mit dem gewählten Versuchsaufbau, weshalb eine Auswertung nicht bzw. nur bedingt möglich war. So führte die Überexpression fluoreszenzmarkierter pflanzlicher Proteine in humanen HEK293- und HeLa-Zellen zu physiologischen Problemen, diese Methode konnte daher nur eingeschränkt als Werkzeug zur Detektion von Cnx1-Interaktionen dienen. Bei *Pull Down*-Experimenten unter Verwendung rekombinant exprimierter Cnx1-Varianten kam es zu starken unspezifischen Bindungen an die Trägermatrix bzw. den *Intein-Tag* der möglichen Liganden, so dass mittels dieser Technik keine Aussagen über eventuelle Wechselwirkungen getroffen werden konnten. Generell ist hinsichtlich der Verwendung von Fusionsproteinen mit Fluoreszenz- oder Affinitäts-*Tags* zu bedenken, dass dadurch Bindungsstellen von Interaktionspartnern blockiert werden können. Entsprechende Versuche wurden daher nach Möglichkeit bei Austausch des *Tags* zwischen Zielprotein (Cnx1) und putativen Liganden bzw. bei intramolekularem Wechsel der *Tag*-Lokalisierung (N- bzw. C-terminal) wiederholt. Weitere Probleme ergaben sich dadurch, dass nicht alle potentiellen Interaktionspartner *in vitro*-translatiert bzw. rekombinant exprimiert werden konnten.

In der Kombination der durchgeführten Versuche konnten für fünf der mittels USPS *Screen* identifizierten Proteine Hinweise auf eine Bindung an Cnx1 gewonnen werden (**Tab. 3.1**).

Tab. 3.1 Zusammenfassung der für potentielle Interaktionspartner erhaltenen experimentellen Hinweise auf Cnx1-Bindung.

Protein	Locus	Anzahl	Experiment (Codierung s. u.)				
			1	2	3	4	5
CCH	At1g66240	1	-	-	+	-	Ø
UreG	At2g34470	2	+	-	+	-	+
TRX-H-3	At5g42980	3	-	+	+	Ø	+
HIT	At3g56490	5	+	-	+	+	+
APRT1	At1g27450	6	-	-	-	+	+

Angegeben ist die Kurzbezeichnung des untersuchten Proteins (s. **Tab. 2.3/2.4**), der genomische *A. thaliana*-Locus (AGI-Code), die Anzahl der identifizierten Klone sowie das für das jeweilige Experiment erhaltene Ergebnis mit + = Indiz für Interaktion, - = kein Indiz für Interaktion, Ø = keine Werte für diesen Versuch.

Codierung der Experimente:

1 = *In vivo*-Co-Lokalisierungsexperimente von Cnx1 mit potentiellen Liganden

2 = *Pull Down*-Experimente mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *A. thaliana* Proteinrohextrakt

3 = *Pull Down*-Experimente mit *Intein*-Fusionen potentieller Liganden und *in vitro*-translatierten Cnx1-Varianten

4 = *Pull Down*-Experimente mit Cnx1-*Intein* und *in vitro*-translatierten potentiellen Liganden

5 = ELISA Assays mit Cnx1 und potentiellen Liganden.

Unter den in **Tab. 3.1** aufgeführten wahrscheinlichsten Kandidaten für eine Cnx1-Wechselwirkung befindet sich mit dem put. Kupfer-Chaperon (CCH) auch jenes Protein, das aufgrund seiner funktionellen Parallelen zur Cnx1E-katalysierten Reaktion (Molybdän-Insertion unter Freisetzung von Kupfer, **3.2.2.1**) bereits bei Auswertung der *Screen*-Ergebnisse als *in vivo*-Interaktionspartner postuliert wurde. Dagegen konnten für das ebenfalls als Cnx1-bindend angenommene PRF2 keine biochemischen Daten erbracht werden, die diese Einstufung bestätigten. Damit stimmen die Ergebnisse der im Anschluss an den USPS *Screen* unternommenen Experimente mit den Resultaten der zielgerichteten Cnx1-Interaktionstests (**2.1.3.4**) überein, die gleichermassen keine Anhaltspunkte für eine PRF2-Cnx1-Bindung lieferten. Es muss allerdings bedacht werden, dass mehrere Versuchsansätze zur Verifizierung einer solchen Wechselwirkung nicht oder nur eingeschränkt durchgeführt werden konnten. So stand PRF2 *His-Tag* nur denaturiert aufgereinigt zur Verfügung, darüber hinaus konnte die *Intein*-Fusion nicht von der Affinitätsmatrix getrennt und für ELISA-Experimente verwendet werden. Eine *in vitro*-Translation von PRF2 war ebenfalls nicht möglich. Trotz der bekannten Profilin-Gephyrin-Interaktion im humanen System ist daher einerseits ein zufälliges Auftreten der PRF2-Klone im Zuge des USPS *Screens* möglich. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass lediglich zwei PRF2-cDNA's identifiziert wurden, obwohl die Profile 1 und 2 ubiquitär und auf hohem Level exprimiert werden und die entsprechenden codierenden Sequenzen daher in der verwendeten cDNA-Bank stark repräsentiert sein dürften (das zu 87 % identische PRF1 wurde nicht detektiert). Andererseits könnte ein biochemischer Interaktions-Nachweis an den erwähnten technischen Problemen gescheitert sein (für PRF1 ergab sich in **2.1.3.4** mittels ELISA Assay ein Hinweis auf Cnx1-Bindung).

3.2.2.1 Das putative Kupfer-Chaperon (CCH) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1

Aufgrund der Co-Kristallisation von Cnx1G mit MPT-AMP durch Kuper *et al.* (2004) und der damit verbundenen Entdeckung eines Kupfer-Atoms als Ligand der MPT-Dithiolengruppe wurde eine Vernetzung von Molybdän- und Kupfer-Stoffwechsel postuliert. Weitere Evidenzen für eine solche Verbindung konnten durch Untersuchungen an Mäusen gewonnen werden, die an der auch beim Menschen auftretenden Wilson-Krankheit (Nagano *et al.*, 1998) leiden. Entsprechende Individuen akkumulieren aufgrund eines Defekts in der Kupfer-Sekretion grosse Mengen des Metalls in der Leber. Jüngst konnte gezeigt werden, dass Leberzellen, die einer erhöhten Kupfer-Konzentration (10 μ M) ausgesetzt wurden, einen drastisch reduzierten Gehalt an aktivem Moco aufweisen (G. Schwarz, unveröffentlichte Ergebnisse).

Hinsichtlich der Funktion des MPT-gebundenen Kupfer-Atoms wurde postuliert, dass dieses *in vivo* als Oxidationsschutz der reaktiven Dithiolengruppe fungieren könnte (Kuper *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung der Aktivierung von *E. coli*-Transkripten in Folge einer Kupfer-Exposition wurden 28 Gene detektiert, deren Aufkommen im Vergleich zum nicht induzierten Zustand um das mehr als dreifache erhöht war (Yamamoto *et al.*, 2004). Darunter befanden sich mit Ausnahme von *moaA* alle Gene des *moa*-Operons, deren Produkte für die Synthese von Precursor Z und MPT verantwortlich sind. Sollte dies zu einer verstärkten Produktion bzw. Akkumulation von MPT führen, könnte die Bildung von Cu-MPT auch als Massnahme zur Chelatierung kurzzeitig auftretender Kupfer-Überschüsse gedeutet werden. Diese Interpretation ist aber spekulativ und eine Übertragbarkeit auf das eukaryotische System fraglich.

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement für alle lebenden Organismen. Da es unter physiologischen Bedingungen zwischen zwei Redoxzuständen (Cu^{1+} und Cu^{2+}) wechseln kann, dient es verschiedenen Oxidasen, Mono- und Di-Oxygenasen (wie der Amin-Oxidase, Ammonium-Mono-Oxygenase, Ceruloplasmin und Lysyl-Oxidase) sowie Enzymen mit einer Funktion bei der Eliminierung von Superoxid-Radikalen (wie der Superoxid-Dismutase und der Ascorbat-Oxidase) als Cofaktor bei Elektronenübertragungs-Reaktionen. Die Kupfer-abhängige Cytochrom-Oxidase ist Bestandteil des terminalen Komplexes der Atmungskette, während in Form des pflanzlichen Plastocyanins ein Kupfer-Protein am photosynthetischen Elektronentransport und damit an der Kohlenstoff-Assimilation beteiligt ist. Obwohl Kupfer also für die Funktion verschiedener Enzyme unverzichtbar ist, stellt es aufgrund seiner hohen Reaktivität, insbesondere der Fähigkeit zur Erzeugung reaktiver Sauerstoff-Spezies, zugleich auch ein physiologisches Problem dar. Aus diesem Grund unterliegen Kupfer-Aufnahme und intrazelluläre Verteilung einer strikten Kontrolle. Für Hefe wurde eine Konzentration an freiem Kupfer von 10^{-18} M errechnet, was der Gegenwart von deutlich weniger als einem ungebundenen Atom pro Zelle entspricht (Rae *et al.*, 1999). Es werden daher Mechanismen benötigt, die eine zielgerichtete Versorgung Kupfer-abhängiger Proteine gewährleisten. Ein solches System stellen die kupferbindenden Metallo-Chaperone dar, die zuerst in Hefe charakterisiert wurden. *S. cerevisiae* besitzt drei bekannte Kupfer-Chaperone: (1.) Das CCS-Protein, welches mit der Kupfer-/Zink-abhängigen Superoxid-Dismutase interagiert (Culotta *et al.*, 1997), (2.) ATX1, das Kupfer an die im Trans-Golgi Netzwerk lokalisierte P-Typ ATPase CCC2 überträgt (Lin *et al.*, 1995), und (3.) COX17, dessen Funktion im Transport von Kupfer zu den Mitochondrien besteht, wo eine Inkorporation in die Cytochrom-Oxidase erfolgt (Glerum *et al.*, 1996).

Kupfer-Chaperone bilden eine evolutionär konservierte Gruppe von Proteinen und sind auch bei Bakterien, Pflanzen und Säugern anzutreffen. Durch funktionelle Komplementation von Hefe-Mutanten konnte mit dem CCH-Protein ein *A. thaliana*-Homologes zu *S. cerevisiae* ATX1 identifiziert werden (Himmelblau *et al.*, 1998). Laut Datenbank-Analysen beinhaltet das Genom von *A.*

Cystein-Reste mittels der freien SH-Gruppen ein einzelnes Cu^{1+} -Ion. Der Modus der Kupfer-Bindung ähnelt dabei sehr an die Koordination des Metall-Atoms im Falle von Cu-MPT-AMP. Dies betrifft sowohl die Bindung durch die beiden Schwefel-Atome der Dithiolengruppe als auch die Tatsache, dass es sich bei der Kupfer-Spezies um Cu^{1+} handelt (G. Schwarz, unveröffentlichte Ergebnisse).

Anhand der momentan verfügbaren Daten ist nicht abzuleiten, zu welchem Zeitpunkt die Ligandierung des Kupfers an das MPT erfolgt. Die Co-Kristallisation von Cnx1G mit Cu-MPT-AMP (Kuper *et al.*, 2004) lässt die Frage offen, ob die Integration des Kupfers bereits im Rahmen der MPT-Synthase-Reaktion bzw. beim Transfer des MPT's auf Cnx1G stattfindet. Sollte dies der Fall sein, wäre eine Interaktion von Cnx1 mit einem Kupfer-Chaperon zwecks Zuführung des Metall-Atoms nicht notwendig. Dagegen geht die Cnx1E-katalysierte Molybdän-Insertion mit der stöchiometrischen Freisetzung des Kupfers einher (Llamas *et al.*, 2005). Da die intrazelluläre Konzentration an freiem Kupfer, wie beschrieben, bei einem gegen Null tendierenden Wert gehalten werden muss, ist der direkte Übergang des substituierten Atoms in einen gebundenen Zustand wahrscheinlich. Unter dieser Voraussetzung wäre die Wechselwirkung von Cnx1 mit einem Metallo-Chaperon zwecks unmittelbarer Aufnahme des entlassenen Kupfers sinnvoll und das identifizierte CCH-Protein dafür der prädestinierte Kandidat.

3.2.2.2 Das putative Nickel-/Nukleotid-bindende Urease Hilfs-Protein (UreG) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1

Unter den fünf mittels USPS *Screen* identifizierten Proteinen, für die biochemische Hinweise auf eine Cnx1-Interaktion gewonnen werden konnten, befindet sich auch das putative Urease Hilfs-Protein (UreG). Die entsprechende cDNA (genomischer Locus At2g34470) wurde zweifach detektiert und codiert für ein Protein von 275 AS Länge (30,1 kDa). Evidenzen für eine Bindung an Cnx1 ergaben sich zunächst durch *in vivo*-Co-Lokalisierung und Co-Sedimentierung von *in vitro*-translatiertem Cnx1 mit UreG-*Intein*. Nachfolgend durchgeführte ELISA-Experimente ließen ebenfalls auf eine solche Wechselwirkung schließen.

Urease katalysiert die Spaltung von Harnstoff. Das Enzym ist sowohl bei Bakterien, eukaryotischen Mikroorganismen und einigen Invertebraten verbreitet (Review in Mobley *et al.*, 1995), aber auch bei Pflanzen, wo es das einzige bekannte Nickel-abhängige Metallo-Enzym darstellt (Gerendas *et al.*, 1999). Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Urease-Komplexes wurden vor allem durch Arbeiten mit dem Bakterium *K. aerogenes* gewonnen (Review in Hausinger, 1997). Demnach ist die strukturelle Grundeinheit ein Trimer aus UreA, UreB und UreC, während die sog. Urease Hilfs-Proteine UreD, UreE, UreF und UreG zur Aktivierung des Apoenzyms durch Ni^{2+} -Inkorporation benötigt werden. Der genaue Prozess der Ni^{2+} -

ständen dürfte der auf diese Weise erzielte Beitrag an der Synthese organischer N-Verbindungen aber gering ausfallen. Es ist daher nicht anzunehmen, dass es eine (UreG-vermittelte) regulatorische Verbindung zwischen Urease-Reaktion und Moco-Biosynthese (und damit Nitrat-Assimilation) gibt. Der Zweck einer möglichen UreG-Cnx1-Interaktion könnte jedoch in der Bereitstellung des UreG-gebundenen Metall-Atoms als Cofaktor der MPT-AMP-Spaltung liegen. Die durch die Cnx1 E-Domäne katalysierte Pyrophosphatase-Reaktion ist *in vitro* abhängig von der Gegenwart zweiwertiger Kationen (Llamas *et al.*, 2005), wobei vor allem Zn^{2+} , aber auch Mg^{2+} , Ni^{2+} und Mn^{2+} die hydrolytische AMP-Freisetzung begünstigen. Jüngst konnte gezeigt werden, dass das UreG-Protein aus *B. pasteurii* spezifisch Zn^{2+} bindet, wobei eine 10fach höhere Affinität im Vergleich zu Ni^{2+} ermittelt wurde (Zambelli *et al.*, 2005). Sollte dieses Ergebnis auf *A. thaliana* UreG übertragbar sein, wäre eine Verbindung zur MPT-AMP-Spaltung denkbar.

3.2.2.3 Thioredoxine (TRX-H-2/TRX-H-3) als mögliche Interaktionspartner von Cnx1

Thioredoxine sind kleine, ubiquitär verbreitete Proteine, die eine Rolle bei der zellulären Redox-regulation spielen. Anhand der Primärstrukturen kann eine Unterteilung in zwei Familien vorgenommen werden: (1.) Proteine mit einer einzelnen Thioredoxin-Domäne (Familie I) und (2.) Vertreter mit einer oder mehreren Thioredoxin-Domänen in Fusion mit zusätzlichen Domänen (Familie II). Die Thioredoxin-Familie I ist im pflanzlichen System von besonderer Bedeutung. Das Genom von *A. thaliana* enthält mindestens 20 Gene, die für entsprechende Thioredoxine codieren (Meyer *et al.*, 2002), während andere Organismen mit einer deutlich geringeren Anzahl auskommen. So sind bei Säugern zwei, bei *S. cerevisiae* drei und bei *E. coli* zwei Thioredoxine beschrieben worden (Spyrou *et al.*, 1997, Gan, 1991, Laurent *et al.*, 1964). Die pflanzlichen Familie I-Thioredoxine werden in die sechs Untergruppen F, H, M, O, X und Y unterteilt (Gelhaye *et al.*, 2004), wobei nur unter den Thioredoxinen des H-Typs cytosolisch lokalisierte Vertreter vorkommen (O-Typ Thioredoxine sind in Mitochondrien lokalisiert, alle übrigen in Chloroplasten). H-Typ Thioredoxine verfügen über ein konserviertes *active site*-Sequenzmotiv der AS-Sequenz WC(G/P)PC und werden durch eine NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase aktiviert, um ihrerseits Zielproteine reduzieren zu können (Gelhaye *et al.*, 2004).

Im USPS Screen wurde die cDNA des Thioredoxins H-Typ 3 (Locus At5g42980) dreifach detektiert. Für das codierte Protein (TRX-H-3, 118 AS) konnten anhand von biochemischen Versuchsansätzen mehrere für eine Cnx1-Interaktion sprechende Anhaltspunkte gewonnen werden. Sowohl natives als auch *in vitro*-translatiertes Cnx1 co-sedimentierten mit der *Intein*-Fusion von TRX-H-3, darüber hinaus ergab sich auch im ELISA Assay ein positives Resultat. Neben

den TRX-H-3-Klonen wurde auch eine cDNA des homologen TRX-H-2 isoliert. Dieses Protein wurde nicht in die experimentelle Verifizierung einbezogen, könnte aber in ähnlicher Weise an Cnx1 binden. Im Vergleich zu TRX-H-3 besitzt es eine N-terminale Extension von 25 AS, die aufgrund ihres hydrophoben Charakters möglicherweise der Membranbindung dient (Shi *et al.*, 1996).

Thioredoxine katalysieren die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken. Für H-Typ Thioredoxine sind verschiedenste Zielproteine bekannt, die einer Vielzahl von Stoffwechselwegen zugeordnet werden können (zusammengefasst in Gelhaye *et al.*, 2004). Die eventuelle Funktion einer Cnx1-Wechselwirkung von TRX-H-2/TRX-H-3 ist rein spekulativ. Sie könnte in einer durch Reorganisation von Disulfidbrücken vermittelten Änderung der Tertiärstruktur liegen, die zur katalytischen Aktivität bzw. zur Wechselwirkung von Cnx1 mit anderen Interaktionspartnern erforderlich ist. Darüber hinaus wäre auch eine Rolle beim reduktiven Schutz der MPT-Dithiolengruppe denkbar, sofern diese in einem intermediären Reaktionsschritt bei Abwesenheit von Kupfer bzw. Molybdän einem Oxidationsrisiko ausgesetzt sein sollte.

3.2.2.4 Die putative Nukleotid-Hydrolase (HIT) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1

Die für das als putative Nukleotid-Hydrolase (HIT) bezeichnete Protein codierende cDNA (Locus At3g56490) wurde im USPS *Screen* fünfmal identifiziert. Eine Datenbank-Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzen (Blastn) ergab zunächst eine Annotierung als „putatives Zinkbindendes Protein/putativer Proteinkinase C Inhibitor“, die Analyse der korrespondierenden AS-Sequenz mittels Blastp bzw. MotifScan zeigte jedoch das Vorhandensein eines sog. HIT-Motives. Die charakteristische AS-Abfolge HXHXHXX (X steht für einen hydrophoben AS-Rest) wird als „Histidin Triad“ bezeichnet und ordnete das detektierte Protein in die Familie der HIT Nukleotid-Hydrolasen und -Transferasen ein, die auf das α -Phosphat von Ribonukleotiden wirken (Review in Brenner, 2002). Es konnte festgestellt werden, dass die Proteine der HIT-Familie tatsächlich weder Zink binden (Lima *et al.*, 1996) noch eine inhibitorische Wirkung auf Proteinkinase C entwickeln (Fraser *et al.*, 1991) und demnach o. a. Annotierung fehlerhaft ist. Vertreter der HIT-Proteine sind ubiquitär verbreitet und bei Bakterien ebenso anzutreffen wie bei höheren Eukaryoten, so dass von einer phylogenetisch alten und hoch konservierten Gruppe von Proteinen ausgegangen werden kann (Brenner *et al.*, 1997). Aufgrund von Substratspezifitäten und Reaktionsmechanismen wurde die HIT-Familie in die drei Untergruppen Hint, Fhit und GalT aufgeteilt. Mitglieder der als evolutionär am ursprünglichsten betrachteten Hint-Subklasse hydrolysieren *in vitro* AMP-Amid-Verbindungen (z. B. Adenosin 5'-Monophosphoramid Hydrolasen), wobei die *in vivo*-Substrate noch unbekannt sind (Brenner *et al.*, 1997).

Im Genom von *A. thaliana* sind mindestens acht für HIT-Proteine codierende Gene enthalten, Erkenntnisse über ihre *in vivo*-Funktionen liegen aber in keinem Fall vor. Das als potentieller Cnx1-Interaktionspartner identifizierte HIT-Protein (NP_567038) besitzt eine Länge von 147 AS und eine Grösse von 16,0 kDa. Im Zuge der experimentellen Verifizierung konnten Hinweise auf Cnx1-Bindung sowohl mittels *in vivo*-Co-Lokalisierung sowie anhand zweier unterschiedlicher *Pull Down*-Experimente und durch ELISA Assays gewonnen werden. Eine Interaktion mit Cnx1 ist daher als wahrscheinlich anzusehen. Entsprechend einer Analyse mittels NCBI Conserved Domain Search besteht die grösste Übereinstimmung des HIT-Proteins mit der Hint-Untergruppe, darüber hinaus werden aber auch Fhit und GalT als homolog zugeordnet, so dass eine Eingrenzung auf eine eventuelle Substratgruppe nicht möglich ist.



Abb. 3.3 Sequenzalignment des identifizierten HIT-Proteins aus *A. thaliana* mit seinen humanen bzw. Hefe-Homologen. Das Alignment wurde unter Verwendung von ClustalW erstellt und mittels BoxShade unterlegt. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Das konservierte HIT-Motiv ist durch eine Box gekennzeichnet. Datenbank-Einträge: HIT *Ath* NP_567038, Hint1 *Hsa* AAH07090, Hnt1 *Sce* CAA98693. *Ath* = *A. thaliana*, *Hsa* = *H. sapiens*, *Sce* = *S. cerevisiae*.

Ein Sequenzalignment (**Abb. 3.3**) mit den nächsten Homologen beim Menschen (Hint1) und bei der Hefe *S. cerevisiae* (Hnt1) zeigt den relativ niedrigen Grad der Übereinstimmung zwischen

den Proteinen, die drei Histidin-Reste der HIT-Domäne im Bereich der Positionen 130-140 sind jedoch strikt konserviert. Aufgrund der geringen Kenntnisse hinsichtlich der physiologischen Funktionen von HIT-Proteinen im allgemeinen und der Vertreter von *A. thaliana* im speziellen ist die Bedeutung einer möglichen HIT-Cnx1-Interaktion spekulativ. Die E-Domäne von Cnx1 spaltet MPT-AMP unter Freisetzung von AMP und kann daher ebenfalls als Nukleotid-Hydrolase betrachtet werden (Llamas *et al.*, 2005), es besteht also eine auffallende Analogie zu den durch HIT-Proteine katalysierten Reaktionen. Darüber hinaus besitzen einige bekannte Substrate von HIT-Proteinen wie z. B. Diadenosin-Polyphosphate eine gewisse Ähnlichkeit zu MPT-AMP. Da die E-Domäne *in vitro* in Gegenwart von Molybdat und Zn^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Ionen die MPT-AMP-Spaltung in Abwesenheit weiterer Proteine katalysieren kann, ist eine Beteiligung des HIT-Proteins an diesem Prozess *in vivo* fraglich, wäre aber denkbar. In der Rolle als Nukleotid-Transferase könnte auch eine Übernahme des durch die E-Domäne freigesetzten AMP's und Übertragung auf ein drittes Protein beispielsweise zwecks ADP-/ATP-Regeneration erfolgen.

3.2.2.5 Die Adenin Phosphoribosyltransferase 1 (APRT1) als möglicher Interaktionspartner von Cnx1

Adenin Phosphoribosyltransferasen (je nach Quelle APT oder APRT abgekürzt) mobilisieren 5'-Phosphoribosyl-1'-pyrophosphat und übertragen den Phosphoribosyl-Rest in einem Mg^{2+} -abhängigen Prozess auf Adenin, wobei AMP und Pyrophosphat gebildet werden. Es handelt sich um ubiquitär verbreitete Enzyme, die sowohl bei Bakterien, Pflanzen als auch bei Säugern vorkommen (Schomberg & Stephan, 1997). Pflanzliche APRT-Proteine besitzen neben ihrer Rolle bei der AMP-Regeneration eine zweite Funktion, die den Homologen anderer Organismen fehlt, indem sie neben Adenin auch bestimmte Cytokinine als Substrate verwenden können (Mok & Mok, 2001). Cytokinine sind Adenin-Derivate, die eine Seitenkette am N6'-Atom besitzen (Shaw, 1994), und haben als Phytohormone in Verbindung mit Auxinen einen Einfluss auf verschiedene Phasen der pflanzlichen Entwicklung (Davies, 1995). Im Genom von *A. thaliana* konnten fünf putativ für APRT-Proteine codierende Gene identifiziert werden, von denen aber offenbar nur drei (*aprt1-3*) exprimiert werden (Allen *et al.*, 2002).

Nach der Identifizierung von sechs cDNA's des APRT1-Proteins im USPS *Screen* mit Prey-Induktion (sowie eines entsprechenden Klons im vorherigen *Screen* ohne Prey-Induktion) erschienen Untersuchungen auf Cnx1-Wechselwirkung vielversprechend. Dabei konnte eine Co-Sedimentierung von *in vitro*-translatiertem APRT1 mit Cnx1-*Intein* festgestellt werden, ebenso ergab sich im ELISA Assay eine APRT1-Cnx1-Bindung. APRT1 (183 AS, 19,7 kDa) ist unter den drei exprimierten *A. thaliana* Adenin Phosphoribosyltransferasen offenbar das primäre En-

zym der Adenin-AMP-Umsetzung, da es die entsprechende Reaktion 42-80fach effizienter katalysiert als APRT3 bzw. APRT2 (Allen *et al.*, 2002). Dagegen besitzt es eine vergleichsweise geringe Affinität für Cytokinine (etwa einen K_m -Wert für Benzyladenin von 800 μM bei 4,5 μM für Adenin; Lee & Moffatt, 1993). *In vivo*-Untersuchungen lassen jedoch den Schluss zu, dass APRT1 dennoch am Cytokinin-Stoffwechsel beteiligt ist. So wies eine *A. thaliana aprt1*-Mutante einen Gehalt von Benzyladenosin-Monophosphat auf, der gegenüber dem Wildtyp um 70 % reduziert war (Moffatt *et al.*, 1991).

Die Funktion einer möglichen Interaktion von Cnx1 mit APRT1 ist völlig offen. Da ATP *in vitro* zur Adenylierung von MPT durch Cnx1G dient (Llamas *et al.*, 2004), scheidet AMP als Produkt der APRT1-Reaktion für diesen Schritt aus. Im Gegenzug katalysiert Cnx1E die Abspaltung von AMP (Llamas *et al.*, 2005) und nicht von Adenin, welches als APRT1-Substrat dienen könnte. Eine unmittelbare Auswirkung von APRT1 auf die Moco-Biosynthese kann auch anhand des Phänotyps von *aprt1*-Mutanten ausgeschlossen werden. Derartige Pflanzen sind aufgrund eines Defekts in der Pollenbildung männlich-steril (Zhang *et al.*, 2002), zeigen aber keine Merkmale, die auf einen Moco-Mangel bzw. Moco-Defizienz hindeuten. Rein spekulativ ist dagegen die Möglichkeit einer APRT1-vermittelten Verbindung der Moco-Biosynthese mit dem Cytokinin-Stoffwechsel.

3.3 Ausblick

Das System des USPS *Two Hybrid Screens* konnte erfolgreich zur Detektion möglicher Cnx1-Liganden eingesetzt werden und bildete die Basis für zellbiologische und biochemische Versuchsansätze zur Verifizierung entsprechender Interaktionen. Im konkreten Fall erwies sich USPS somit als Fortschritt gegenüber konventionellen Methoden der Suche nach Protein-Wechselwirkungen (einschliesslich GAL4 *Two Hybrid*), deren Anwendung zwecks Identifizierung putativer Interaktionspartner der pflanzlichen Molybdän-Insertase bislang ergebnislos verlief.

Die aus dieser Arbeit resultierende Entdeckung von fünf potentiellen Liganden des Cnx1-Proteins könnte einen Beitrag zum tieferen Verständnis des dritten Schritts der Moco-Biosynthese in *A. thaliana* leisten. Zukünftige Versuchsansätze dürften zunächst darauf ausgelegt sein, die bereits erbrachten Hinweise auf Wechselwirkung zu bestätigen. Mit diesem Ziel könnten z. B. Experimente zur Co-Lokalisierung in pflanzlichen Zellen vorgenommen werden. Nachfolgend wären insbesondere Untersuchungen hinsichtlich möglicher funktioneller Zusammenhänge zwischen Cnx1 und seinen neuen Interaktionspartnern von Interesse. Derzeit lassen sich nur Hypothesen bezüglich entsprechender Verbindungen formulieren, die als Impulse zur Auslegung weiterführender Versuchsansätze zu verstehen sind. Experimente zum postulierten

Kupfer-Transfer von CCH auf Cnx1-MPT bzw. von Cnx1-Cu-MPT auf CCH im Zuge der Molybdän-Insertion könnten Aufschluss darüber geben, ob in einem solchen Mechanismus eine Schnittstelle zwischen Molybdän- und Kupfer-Metabolismus besteht. Vielversprechend erscheinen darüber hinaus Untersuchungen zu einer möglichen Beteiligung der Proteine HIT und UreG an der Cnx1E-vermittelten MPT-AMP-Hydrolyse. Dagegen ist die Funktion einer putativen Einbindung von Cnx1 in das Thioredoxin-System bzw. den Energie- oder Phytohormon-Stoffwechsel durch Interaktion mit APRT1 nach derzeitigem Kenntnisstand nicht weiter zu präzisieren.

4. Material und Methoden

4.1 Laborstandards

4.1.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol, Duchefa, Fluka, Gibco, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Zur Modifizierung von DNA wurden Enzyme der Firmen Amersham Biosciences, Boehringer, Hybaid, MBI Fermentas, Promega und Stratagene benutzt.

4.1.2 Verwendete Organismen-Stämme

Tab. 4.1 Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Organismen-Stämme.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz	Kultivierung	Verwendung
<i>Escherichia coli</i>				
DH5 α	<i>supE 44Δlac U169 (Δ80<i>lacZ</i>ΔM15) hsd R17 <i>recA endA 1 gyrA 96 thi-1 relA 1</i></i>	Hanahan (1983)	LB; 37°C	Klonierung, DNA-Präparation
BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Novagen	LB; 22°C - 37°C	Expression
Rosetta (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)</i>	Novagen	LB; 22°C - 37°C	Expression
ER2566	<i>F-λ-fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 genel gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr 73: miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1 (TetS) endA1 [dcm]</i>	New England Biolabs	LB; 22°C - 37°C	Expression
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU,K</i>	BD Biosciences	LB; 37°C	Plasmid-Präparation aus Hefe
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4D, gal80D, LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ</i>	BD Biosciences	YPD oder Selektiv, 30°C	GAL4 Two Hybrid
JD53	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3 112, lys2-801, trp1Δ63, ura3-52</i>	Johnsson (1994a; 1994b)	YPD oder Selektiv, 30°C	USPS Two Hybrid

4.1.3 Verwendete Plasmide

Tab. 4.2 Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide.

Bezeichnung	Selektion	Referenz	Verwendung
pGEM-T Easy	amp; blue-white	Promega	PCR-Klonierung, Sequenzierung
pQE30	amp	Qiagen	Überexpression in <i>E. coli</i>
pQE30Xa	amp	Qiagen	Überexpression in <i>E. coli</i>
pQE60	amp	Qiagen	Überexpression in <i>E. coli</i>
pQE80	amp	Qiagen	Überexpression in <i>E. coli</i>
pTYB2	amp	New England Biolabs	Überexpression in <i>E. coli</i>
pTYB12	amp	New England Biolabs	Überexpression in <i>E. coli</i>
pcDNA3	amp	Invitrogen	<i>in vitro</i> -Transkription/Translation
pGAD10	amp	BD Biosciences	GAL4 <i>Two Hybrid</i>
pGADT7	amp	BD Biosciences	<i>in vitro</i> -Transkription/Translation, GAL4 <i>Two Hybrid</i>
pGBKT7	kan	BD Biosciences	GAL4 <i>Two Hybrid</i>
pMet C _{ub} R-URA3	amp	Dunnwald (1999)	USPS <i>Two Hybrid</i>
pN _{ub}	amp	Dunnwald (1999)	USPS <i>Two Hybrid</i>
pDsRed-N1	kan	BD Biosciences	<i>in vivo</i> Co-Lokalisierung
pEGFP-C2	kan	BD Biosciences	<i>in vivo</i> Co-Lokalisierung

Auf der Basis der hier angeführten Plasmide wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte und Subklone erstellt. Die Klonierungsschemata der jeweiligen Konstrukte sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

4.2 Molekularbiologische Standardmethoden

4.2.1 Klonierungstechniken

Die molekularbiologischen Standardmethoden umfassen alle Arbeiten an rekombinanter DNA auf der Ebene von linearen Fragmenten und Plasmiden. Darunter fällt hauptsächlich die Neukombination von DNA, d. h. vor allem deren Bearbeitung mit Restriktionsenzymen mit dem Ziel der Klonierung (ausgehend von PCR-Fragmenten, 4.2.2.) bzw. der Umklonierung in andere

Vektoren. Diese Techniken fanden zumeist Anwendung zur Erzeugung von Konstrukten zur heterologen Expression von Genen in *E. coli*, *S. cerevisiae* bzw. Säugerzellen oder aber der *in vitro*-Transkription/Translation (4.3.2).

Der Einsatz der DNA-modifizierenden Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase oder Alkalische Phosphatase erfolgte entsprechend den Herstellerangaben oder nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von Ligationsansätzen bzw. Plasmid-DNA sowie die Erzeugung der hierfür benötigten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden ebenfalls entsprechend Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Plasmid-DNA-Minipräparationen wurden standardmässig mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey & Nagel) vorgenommen. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Vorgabe von Sambrook *et al.* (1989). Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurden der Easy-Pure™ Kit von Biozym oder der NucleoSpin Extract Kit (Macherey & Nagel) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die sog. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) wurde im Zuge dieser Arbeit in einer Vielzahl von Varianten mit z. T. sehr unterschiedlichen Zielen eingesetzt, wie beispielsweise der Amplifikation einer Gensequenz aus einer cDNA-Bank zwecks Klonierung in ein Expressions-Plasmid oder der Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern im Rahmen eines *Yeast Two Hybrid Screens*. Je nach Anforderung ergaben sich daher Abweichungen vom Standardprotokoll [Sambrook *et al.* (1989)] sowie hinsichtlich der einzusetzenden DNA-Polymerase. Für Amplifikationen mit grösstmöglicher Genauigkeit wurde die *Pwo*-Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt, die sich durch eine besonders geringe Fehlerfrequenz auszeichnet. Zu analytischen Zwecken konnte eine *Taq*-Polymerase verwendet werden, deren höhere Prozessivität in den entsprechenden Fällen von Vorteil war. Auch können *Taq*-Amplifikate direkt in sogenannte TA-Vektoren mit kompatiblen Thymin-Überhängen (wie pGEM-T Easy™, Promega) kloniert werden. Alle DNA-Polymerasen wurden von Peqlab bzw. Hybaid bezogen und für PCR-Experimente die Thermocycler-Geräte „Gen Amp PCR-System 2400“ (Perkin-Elmer) bzw. „PCR-Express Gradient“ (Hybaid) eingesetzt.

4.2.2.1 PCR-Mutagenese

Zur Klonierung diverser Expressionskonstrukte war es erforderlich, an festgelegten Positionen neue, mit dem Ziel-Vektor kompatible Restriktionsschnittstellen in die cDNA zu integrieren. Hierzu wurden PCR-Amplifikationen mit mutagenisierenden Primern durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl erfolgte die PCR-Reaktion in Gegenwart von 1 µM eines jeden Primers, 125 µM eines jeden Nukleotides, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U *Pwo*- bzw. *Taq*-DNA-Polymerase. Für die Amplifikation waren in der Regel 20-25 Zyklen ausreichend, wobei einzelne Parameter wie Annealingtemperatur und -dauer sowie Elongationszeit den jeweiligen Bedingungen angepasst wurden. Für sehr niedrig repräsentierte cDNAs wurde die Zyklenzahl auf max. 40 erhöht. Das Standard-Protokoll für die Amplifikation von rekombinanter DNA setzte sich folgendermaßen zusammen: Einmalige Denaturierung bei 94°C für 5 min, 20-25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 54°C für 1 min und Elongation bei 72°C in Abhängigkeit von der Template-Länge (ca. 1000bp/min) sowie eine abschliessende Endsynthese bei 72°C für 6-10 min.

4.2.2.2 Fusions-PCR

Zur Erzeugung von trunkierten Varianten rekombinanter Proteine wurde die Fusions-PCR eingesetzt. Dies war beispielsweise erforderlich, um auf DNA-Ebene interferierende Bereiche zwischen den für eine Protein-Subdomäne codierenden Sequenzen zu eliminieren. Hierzu wurden zunächst zwei Teil-PCR-Fragmente erzeugt, die in der Region überlappen, in der es nachfolgend zur Fusion kommen soll. Üblicherweise werden die Überlapp-Bereiche durch den 5'-Primer des einen und den 3'-Primer des anderen Fragmentes gebildet. Beide Primer sind dadurch zueinander partiell komplementär und garantieren so die spätere Fusion der Teil-Fragmente in dem vorgesehenen Abschnitt. Für die Fusions-PCR müssen die Teil-Fragmente zunächst gemeinsam denaturiert werden, damit deren Einzelstränge miteinander paaren können. In Gegenwart von Nukleotiden und DNA-Polymerase (aber zunächst ohne Primer) werden die fusionierten Einzelstränge zu Doppelsträngen aufgefüllt und nach Zugabe der endständigen Primer in ihrer vollen Länge amplifiziert. Ein typisches Protokoll für die Fusion von je ca. 20 ng Teil-Fragment-DNA durch 2,5 U *Pwo*-Polymerase und je 125 µM dNTP sieht nach 4 minütiger Denaturierung bei 94°C fünf Zyklen von je 30 s bei 94°C, 60 s bei 54°C, 2 min bei 72°C vor, bevor die Primer in Konzentrationen von je 1 µM zugegeben werden. Das Programm wird wie zuvor wiederholt, jedoch mit 20 Zyklen und einer abschliessenden Endsynthese von 6-10 min bei 72°C.

4.2.2.3 Yeast Colony PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *Yeast Two Hybrid*- (YTH) Ansätze zur Detektion von Protein-Wechselwirkungen durchgeführt. Um im Falle positiver Parameter die Identifikation des potentiellen Interaktionspartners zu beschleunigen, wurde eine PCR-Amplifikation auf der Basis von Hefe-Kolonien vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde mit einem Zahnstocher etwas Zellmaterial von einer frischen Kolonie (nicht älter als drei Tage) abgenommen und in 25 µl frisch hergestellter 20 mM NaOH resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 2 µl für einen PCR-Ansatz verwendet. Dabei betrug das Gesamtvolumen 25 µl und die Primer wurden so gewählt, dass spezifisch das cDNA-Fragment des *Bait*-Vektors vervielfältigt wurde. Durch die Verwendung von *Taq*-Polymerase (ohne 3'→5'-Exonuklease-Aktivität) wurde es möglich, den PCR-Ansatz ohne weiteren Reinigungsschritt einem Restriktionsverdau mit einem sog. *frequent cutting enzyme* (z.B. *AluI*, *HaeIII*) zu unterziehen. Sofern erforderlich, konnte das PCR-Fragment auch gereinigt und sequenziert werden.

4.2.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde stets hochreine, über DNA-Isolationskits präparierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel) oder PCR-Amplifikat-DNA (NucleoSpin Extract, Macherey & Nagel oder Easy-Pure™, Biozym) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

4.3 Proteinbiochemische Standardmethoden

4.3.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Das Modellbakterium *E. coli* ist aufgrund seiner leichten Handhabung sehr gut für die präparative Synthese rekombinanter Proteine geeignet. Dies bezieht sich sowohl auf die einfache Transformierbarkeit der Bakterien mit einem gewünschten Expressionsplasmid als auch auf Kultivierung, Zellaufschluss und Lagerung der entsprechenden Klone.

Die während dieser Arbeit zur Überexpression verwendeten *E. coli*-Stämme sind unter **4.1.2** aufgeführt. Kultivierung erfolgte standardmässig bei 37°C, konnte aber zur langsameren Expression (ggf. Erhöhung des löslichen Proteinanteils) bis auf 22°C gesenkt werden. Es wurden zunächst ÜN-Vorkulturen angelegt und von diesen die Hauptkulturen in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:500 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5\text{--}0,8$ inkubiert, bevor die Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG erfolgte (dies gilt für beide hier verwendeten Expressionssysteme, **4.3.1.1** und **4.3.1.2**). Die optimale Expressionszeit muss für jedes rekombinante Protein gesondert ermittelt werden (4–30 h). Zur Zellernte wurde die Bakteriensuspension für 5 min bei 8000 x g zentrifugiert und das Zellpellet vom Überstand getrennt. In dieser Arbeit wurde zumeist mechanischer Zellaufschluss mittels Sonifizierung (Branson Sonifier 250) oder French Press (French Pressure Cell Press, Aminco) durchgeführt, z. T. durch Zugabe von Lysozym (2 mg/ml) enzymatisch unterstützt. In einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt (20 min bei 39000 x g und 4°C) wurden die Zelltrümmer vom Protein-Rohextrakt separiert, letzterer kann anschliessend zur Western-Blot Analyse oder für weitergehende Reinigungs- bzw. Konzentrationsschritte verwendet werden.

4.3.1.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von *His-Tag* Proteinen

Zur spezifischen Reinigung eines Proteins aus bakteriellem Rohextrakt bietet das QIAexpress-System (Qiagen) eine effiziente Methode. Die zu diesem Zweck verwendeten pQE-Vektoren exprimieren das Zielprotein als N- (pQE30, pQE80) oder C-terminale Fusion (pQE60) mit sechs Histidin-Aminosäureresten. Zur Reinigung von *His-Tag* Proteinen macht man sich die hochaffine Wechselwirkung zwischen Nickel- (Ni^{2+}) Ionen und Polyhistidin-Resten an einer Nitrilo-tri-Acetat (NTA) Superflow Matrix (Ni-NTA, Qiagen) zunutze. Die Ni^{2+} -Ionen werden von der NTA-Matrix komplexiert und dadurch immobilisiert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Protein-Rohextrakt können die verunreinigenden Proteine in mehreren Waschschritten weitgehend entfernt werden, während die *His-Tag* Proteine gebunden bleiben. Die Elution des Ziel-Proteins kann durch Erniedrigung des pH-Wertes oder durch einen Kompetitor wie z. B. Imidazol (so in dieser Arbeit) oder Histidin erzielt werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden 2 ml Ni-NTA-Matrix je Liter Kulturvolumen eingesetzt. Pufferbedingungen sowie Reinigungsprotokoll und Regeneration der Matrix sind den Herstellerangaben (QIAexpressionist™, Qiagen) zu entnehmen.

4.3.1.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen mittels *Intein-Tag*

Das IMPACT™-System (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) nutzt die induzierbare, autokatalytische Aktivität eines *Protein-splicing* Elements (*Intein*), um das Zielprotein nach der Reinigung aus dem Rohextrakt vom Affinitätstag zu trennen. Es bietet somit im Gegensatz zum QIAexpress-System die Möglichkeit, ein rekombinantes Protein ohne Anhang weiterer Aminosäuren zu erhalten, die die Charakteristika des Proteins beeinflussen könnten. Die im Zuge dieser Arbeit eingesetzten Vektoren pTYB2 bzw. pTYB12 (New England Biolabs) fusionieren das Zielprotein an einen C- bzw. N-terminalen *Tag* aus *Intein* und Chitin-bindungsdomäne, letztere bindet während der Reinigungsprozedur mit hoher Affinität an eine Chitin-Matrix. Die Matrix-gekoppelte *Intein*-Fusion kann effektiv für *Pull Down*-Experimente verwendet werden (4.3.12).

Das *Intein* katalysiert einen N-S-Acylshift der Peptidbindung an der Fusionsstelle zum Zielprotein, wodurch beide Domänen einen Thioester über die Cysteinseitenkette der ersten *Intein*-Aminosäure ausbilden. In Gegenwart von Thiolen wie DTT oder β -Mercaptoethanol erfolgt die spezifische Selbstspaltung des Thioesters unter Freisetzung des nativen Zielproteins, während das *Intein* über die Chitinbindungsdomäne mit der Affinitätsmatrix verbunden bleibt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tropfsäulen wurden am Boden mit einer Fritte verschlossen und mit Chitin-Matrix (Kapazität: 2 mg/ml) befüllt. Nach Absetzen der Matrix wurden die Säulen bei 4°C dem Protokoll entsprechend äquilibriert, beladen und nach Einsinken der Extrakte mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Das jeweilige Protein wurde durch Zugabe von 1,5 Säulenvolumen Elutionspuffer bei 4°C ÜN eluiert.

4.3.2 *in vitro*-Transkription/Translation von Proteinen

Das System der *in vitro*-Transkription und -Translation ermöglicht die Synthese einer geringen Menge eines Zielproteins in einem zellfreien Extrakt aus Kaninchen-Reticulocyten (TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega). In diesem Kit sind alle Bestandteile einschliesslich T7 RNA-Polymerase und Translationsmaschinerie enthalten, um bei Zugabe eines Plasmides mit T7-Promotor (pcDNA3 oder pGADT7) *in vitro* das codierte Zielprotein zu erzeugen. Damit bietet das System die Möglichkeit, ggf. auftretende Probleme mit rekombinanter Expression in *E. coli* zu umgehen. Durch Zugabe von [³⁵S]-gekoppeltem Methionin wird das translatierte Polypeptid radioaktiv markiert, so dass trotz einer geringen Ausbeute eine ho-

he Sensitivität durch autoradiographische Detektion mittels Fotofilm (BioMax, Kodak) gewährleistet ist. Somit kann man eine grössere Anzahl von Proteinen effizient nachweisen, ohne jeweils über spezifische Antikörper für Western-Blot Analysen verfügen zu müssen. Die *in vitro*-Transkription und -Translation (üblicherweise in 25 µl Gesamtvolumen bei Einsatz von 20 µl TNT-Lysat, 0,5 µl Redivue™ L-[³⁵S]-Methionin (15 µCi/µl; Amersham Biosciences) und 1 µg Plasmid-DNA) wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und die markierten Translate sowohl für *Dot Overlay*- (4.3.11) als auch für *Pull Down*-Experimente (4.3.12) eingesetzt.

4.3.3 Präparation von *Arabidopsis thaliana* Protein-Rohextrakt

Für *Pull Down*-Experimente mit nativem Protein wurden Rohextrakte aus *Arabidopsis thaliana* Blattmaterial hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das bei –70°C gelagerte Pflanzenmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver homogenisiert und anschliessend in einem Verhältnis von 1:1 (w/v) in Puffer aufgenommen (200 mM HEPES pH 7,5, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF, 5 % Glycerol) und gevortext. Nachfolgend wurde die Suspension für 10 min bei 18000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bei –70°C eingefroren.

4.3.4 Chromatographische Auftrennung von Proteinen an der FPLC

Nach einer affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*-Rohextrakt sind ggf. weitere Schritte erforderlich, um das Zielprotein von Kontaminationen zu trennen bzw. eine Konzentrierung zu erzielen. Für diese Versuche wurden sowohl das FPLC® System als auch die Äkta Basic 10 verwendet (beide von Amersham Biosciences). Diese Niederdruck-Chromatographiesysteme können zum einen für Gelfiltrationsläufe benutzt werden, bei denen eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Grösse im isokratischen Fluss erfolgt (4.3.4.1). Zum anderen können Proteine in Lösung auch aufgrund ihrer Ladungsunterschiede fraktioniert werden (Anionenaustausch-Chromatographie, 4.3.4.2). Unabhängig vom Auftrennungsprinzip wird die Passage der Proteinfractionen durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt, so dass die einzelnen Absorptionsmaxima den entsprechenden Fraktionen im Kollektor zugeordnet und diese dann für weitere Versuche benutzt werden können.

4.3.4.1 Gelfiltration

Bei einer Gelfiltration werden die Proteine an einer aus porösen Kügelchen bestehenden Matrix entsprechend ihres Molekulargewichtes separiert. Damit wird es möglich, nicht nur verschiedene Proteine voneinander zu trennen, sondern ggf. auch Multimerformen eines Proteins, sofern diese bei den gewählten Pufferbedingungen stabil sind. Wird eine Mischung von Proteinen unterschiedlicher Grösse auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, diffundieren die kleineren Proteine mit grösserer Wahrscheinlichkeit in die Poren, wodurch ihre Elution gegenüber grösseren Proteinen verzögert wird. Die Gelfiltration ist hoch reproduzierbar und kann daher auch zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck werden Kalibriergeraden mit Proteinen bekannter Grösse erstellt.

Für Gelfiltrationsläufe wurde eine Superdex[®] 200 HR 10/30-Säule (Amersham Biosciences) verwendet und 20 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA als Puffer gewählt; die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

4.3.4.2 Anionenaustausch-Chromatographie

Für den Zweck der Anionenaustausch-Chromatographie wählt man Säulen mit kovalent gebundenen, positiv geladenen Matrixbestandteilen und bringt die Proteine in einen Puffer, dessen pH-Wert die Deprotonierung ihrer geladenen Gruppen fördert. Da jedes Protein bei gegebenen Parametern eine individuelle Netto-Ladung besitzt, bindet es mit einer spezifischen Affinität an die Matrix. Die Fraktionierung erfolgt durch Elution in einem linearen Gradienten eines Gegenions, das die gebundenen Proteine von der Matrix verdrängt. Die mit grösserer Affinität bindenden Proteine eluieren dabei in späteren Fraktionen.

Zur Anionenaustauschchromatographie wurde eine UnoQ1-Säule (BioRad) benutzt, deren Matrix [-N+(CH₃)₃]-Gruppen als Ladungsträger enthält, sowie 20 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA ±1 M NaCl als Hoch- bzw. Niedrigsalzpuffer.

4.3.5 Umpuffern von Proteinlösungen

Auch zum Umpuffern bzw. Entsalzen von Proteinlösungen kommt das Prinzip der Gelfiltration (4.3.4.1) zum Einsatz. Dabei kamen für Lösungen bis 400 µl vorgepackte Sephadex G-50 Nick-Säulen und für Volumina bis 2,5 ml vorgepackte Sephadex G-25 PD-10 Säulen (beide Amersham Biosciences) zur Anwendung. Die Säulen wurden jeweils mit 5 Säulenvolumen des ge-

wählten Puffers äquilibriert, mit der Probe beladen und die Differenz zum maximalen Probenvolumen an Puffer zugegeben. Die nun umgepufferte Proteinfraction wurde mit 5/4 Volumen (Nick-Säule) bzw. 7/5 Volumen (PD-10 Säule) des Probenvolumens eluiert.

4.3.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren. Dabei werden die Lösungen durch eine semipermeable Membran filtriert. Die Membran ist nur für kleine Moleküle (Pufferionen, H₂O) durchlässig, wohingegen Proteine unterschiedlicher Grösse in Abhängigkeit von der gewählten Membran zurückgehalten werden. Für kleine Volumina bis 2 ml wurden Centricon-, für bis zu 15 ml Centriprep-Konzentratoren (beide Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 3-30 kDa entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.3.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts eines Rohextraktes erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von 5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H₂O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad, Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde. Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (1990) ermittelt.

4.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 7,5 % und 17 % nach Laemmli (1970) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer (50 % Glycerol, 3,5 % SDS, 15 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel. Im Anschluss daran erfolgte entweder eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel über eine Färbung mit Coomassie-Lösung (Färbelösung 25 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,5 % Coomassie-Blau G-250; Entfärbelösung 25 % Methanol, 10 % Essigsäure) oder aber der Transfer der Proteine auf eine

Membran zur sensitiveren Detektion mittels radioaktiver Markierung bzw. Immunblot-Analyse (4.3.9).

4.3.9 Immunblot-Analyse (Western-Blot)

Zur Durchführung einer Immunblot-Analyse wurden die Gele nach erfolgter SDS-PAGE für ca. 10 min in Transferpuffer (10 % MeOH in 1x Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine auf die Trägermembran (HybondTM-P, Amersham Biosciences; Roti[®]-PVDF, Roth) in einem diskontinuierlichen Semi-Dry-Blot (Biometra) wurden 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt, bevor die Membran (zuvor mit MeOH benetzt, mit H₂O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert), das Gel sowie weitere 3 Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotten erfolgte für 1 h mit 3 mA/cm² Gelfläche. Nach dem Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) wurden die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5 % in 1x TBS) angefärbt.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (2 % BSA in 1x TBS) inkubiert, bevor der in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. In dieser Arbeit wurden als primäre Antikörper der monoklonale Anti-*His-Tag* Antikörper aus Maus (1:3000, Dianova) sowie ein polyklonaler Antikörper gegen Cnx1G aus Kaninchen (1:800, AG Mendel) und verschiedene monoklonale Antikörper gegen Cnx1E und Cnx1G aus Maus (1:200, AG Mendel) verwendet. Nach 2 h Inkubation unter Schwenken bei RT wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 min in TBSTXS (0,1 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % SDS in 1x TBS) und einmaliges Waschen für 10 min in 0,8 % NaCl entfernt. An eine erneute 5 minütige Blockierung schloss sich die Inkubation mit dem sekundären, an Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper Anti-Maus-IgG bzw. Anti-Kaninchen IgG (beide Sigma) für weitere 1,5 h bei RT unter Schwenken an. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8 % NaCl folgte die Färbereaktion der Alkalischen Phosphatase durch Zugabe von 10 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 100 mM NaCl, 6,4 mM MgCl₂) mit darin enthaltenen 33 µl BCIP- und 66 µl NBT-Lösung (beides Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und Waschen der Membran mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

4.3.10 **Enzyme Linked Immunosorbend Assay (ELISA)**

Der ELISA wurde als *solid phase binding assay* zur Untersuchung der möglichen Interaktion zweier aufgereinigter Proteine *in vitro* eingesetzt (vergl. auch *Dot Overlay Assay*, 4.3.11). Dabei wird ein Protein immobilisiert und mit seinem potentiellen Interaktionspartner in Lösung überschichtet. Die Adsorption des zu immobilisierenden Proteins erfolgt an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte, wobei eventuelle Protein-Protein-Wechselwirkungen durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Im Zuge dieser Arbeit wurden mögliche Interaktionspartner des Cnx1-Proteins in einer Konzentration von 50 pmol/200 µl *well* an einer 96-*well* F96 Maxi-sorp Nunc-Immuno Plate (Apogent) über Nacht unter Schwenken bei 4°C adsorbiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor zur Absättigung freier Bindungsstellen für 2 h bei RT blockiert wurde (Blockierungslösung 1 % BSA in PBS). Nach weiteren zwei Waschschritten (PBS) wurde für 1 h mit 5-250 pmol Cnx1 bzw. Cnx1E/Cnx1G überschichtet. Im Anschluss an erneutes Waschen und Blockieren wurde der primäre Antikörper (monoklonal Anti-E bzw. Anti-G, 1:900 in Blockierungslösung) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus, 1:10000) überschichtet und dieser nach Inkubation und Waschen mittels einer Farbreaktion mit ABTS (2,2'-Azino-bis[3-Ethylbenzthiazolin-Sulfonsäure]) als Substrat nachgewiesen. Die Farbentwicklung wurde mit einem ELISA-Reader (VERSA_{max} Microplate Reader, Molecular Devices) dokumentiert.

4.3.11 **Dot Overlay Assay**

Der sog. *Dot Overlay Assay* dient dem *in vitro*-Nachweis spezifischer Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei wird ein gereinigtes Protein in nativer Form durch das *Dot Blot*-Verfahren auf eine Membran transferiert und mit einem *in vitro*-translatierten Protein in Lösung co-inkubiert. Zu diesem Zweck wurden 50-600 pmol rekombinantes Protein, verdünnt in 200 µl eines geeigneten Puffers, mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Dot Blotter 96, Biometra) punktförmig auf einer Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll) immobilisiert. Eine PonceauS-Färbung diente der Überprüfung des Transfers. Freie Bindungsstellen der Nitrocellulose wurden mit 5 % Milchpulver in TBST abgesättigt. Vor der eigentlichen Bindung wurden 12,5-25 µl eines *in vitro*-Translationsansatzes (4.3.2) über eine Nick-Säule in 1 % BSA in TBS umgepuffert, um verbliebenes freies [³⁵S]-Methionin zu entfernen, und anschliessend für drei bis vier Stunden bei RT mit den entsprechenden Membranen co-inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (1 %

BSA/TBS) zum Entfernen unspezifisch gebundenen Translats wurden die Membranen getrocknet und für 3-48 h zur Exposition eines Fotofilms (BioMax, Kodak) verwendet.

4.3.12 Pull Down Assay

Eine weitere Methode zum Nachweis interagierender Proteine ist der sog. *Pull Down Assay*. Dieser Ansatz beruht darauf, ein rekombinant exprimiertes Zielprotein an eine Trägermatrix zu koppeln und mit einer Lösung zu inkubieren, die mögliche Interaktionspartner des immobilisierten Zielproteins enthält. Nach mehreren Wasch-Schritten zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine kann der Interaktionspartner mittels SDS-PAGE und Elektrophoretischer Transfer auf eine PVDF-Membran überführt und detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorzugsweise *In-tein*-fusionierte Zielproteine zum *Pull Down* eingesetzt, da diese an die sehr selektiv bindende Chitin-Matrix gekoppelt wurden und somit unspezifisch bindende Proteine bereits bei geringer Wasch-Intensität zuverlässig entfernt werden konnten. Es ist jedoch auch möglich, an NiNTA-Matrix gebundene *His-Tag* Fusionsproteine zum *Pull Down* zu verwenden, jedoch muss zur Reduzierung unspezifischer Bindung ein Zusatz von 20 mM Imidazol zum Waschlösungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl) erfolgen. Es kann sowohl Protein-Rohextrakt, rekombinant exprimiertes Protein als auch *in vitro*-Translat zur Co-Inkubation mit dem Zielprotein eingesetzt werden und dementsprechend die Detektion durch Western-Blot oder Autoradiographie erfolgen.

In der Regel wurden 5-7,5 µl mit dem Zielprotein saturierte Trägermatrix für 30 min-1 h mit einem möglichen Interaktionspartner co-inkubiert, bevor der ÜS nach Zentrifugation für 4 min bei 2000 x g vollständig entfernt wurde. Nach 4-6 Waschschritten (Zugabe von je 1 ml Waschlösungspuffer und Entfernung nach Zentrifugation wie o. a.) wurde die Matrix in 25 µl 1x Ladepuffer für 5 min auf 95°C erhitzt und für SDS-PAGE, Blot und Detektion verwendet.

4.4 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.1 Yeast Two Hybrid Assays

Yeast Two Hybrid- (YTH) Techniken stellen eine sensitive Methode zur Detektion von Protein-Interaktionen *in vivo* dar. Solche Wechselwirkungen können u. U. einen so schwachen bzw. transienten Charakter haben, dass sie biochemisch nur schwer oder überhaupt nicht nachzu-

weisen sind, wenngleich sie im Einzelfall für die Funktion komplexer biologischer Systeme essentiell sein können (Guarente, 1993, Estojak *et al.*, 1995). YTH-Ansätze bedienen sich lebender Hefe-Zellen für Expression und Interaktions-Nachweise, wodurch die beteiligten Proteine mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in ihren nativen Konformationen vorliegen als bei experimentell zu bestimmenden Pufferbedingungen *in vitro*. Die Bezeichnung *Two Hybrid* rührt daher, dass zwei potentielle Interaktionspartner („Köder- und Beute“-Protein, engl. *Bait* und *Prey*) jeweils als Fusionskonstrukte (Hybride) mit Reporterproteinen bzw. deren Domänen exprimiert werden, wobei letztere im Fall der Wechselwirkung zwischen *Bait* und *Prey* eine Signalkaskade auslösen, die zur Detektion der Interaktion führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene YTH-Methoden angewendet (4.4.1.1 und 4.4.1.2), die sich in Art und Ablauf der Signalgebung unterscheiden.

4.4.1.1 GAL4 *Two Hybrid* Assay

Viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren sind aus zwei unabhängigen Domänen, der DNA-Bindungsdomäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD), aufgebaut. Im GAL4 *Two Hybrid*-System sind diese Domänen getrennt an *Bait*- und *Prey*-Protein gekoppelt. Die Hybrid-Proteine sind alleine jedoch transkriptionell inaktiv. Die DNA-Bindungsdomäne kann zwar an eine spezifische Promotor-Sequenz binden, aber erst durch eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine kommt es zur Assoziation mit der Aktivierungsdomäne, was dann zu einer Initiierung der Transkription führt. Über Reportergene, die hierdurch aktiviert werden, lässt sich die Interaktion nachweisen. Das in dieser Arbeit benutzte MATCHMAKER 3-System (BD Biosciences) basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 und den Reportergenen *lacZ*, *his3*, *mel1* und *ade2*. Das *lacZ*-Gen vermittelt eine β -Galaktosidase-Aktivität, das *his3*-Gen erlaubt das Wachstum auf Histidin-freiem Medium, *ade2* ermöglicht Wachstum auf Adenin-freiem Medium und *mel1* vermittelt eine α -Galaktosidase-Aktivität.

Das GAL4 *Two Hybrid* System wurde in dieser Arbeit für gezielte Interaktionstests verwendet. Zu diesem Zweck wurden die für *Bait* und *Prey* codierenden cDNA-Sequenzen in die entsprechenden Vektoren (pGBKT7 und pGADT7) kloniert und paarweise in kompetente AH109-Zellen transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf Platten mit SD-Selektionsmedium ausplattiert. Zur Selektion wurden zwei verschiedenen stringente Medien gewählt. Hoher Selektionsdruck: SD Leu⁻Trp⁻His⁻Ade⁻X- α -Gal⁺ und niedriger Selektionsdruck: SD Leu⁻Trp⁻His⁻. Nur stark interagierende Proteine ermöglichen ein Wachstum auf Platten mit hohem Selektionsdruck, sofern der Transformationsansatz direkt auf diese Platten ausgebracht wird. Deshalb wurden die Ansätze zunächst auf Medium mit niedrigem Selektionsdruck ausplattiert, um bei Wachstum diese dann auf Platten mit hohem Selektionsdruck auf Interaktion zu überprüfen.

4.4.1.2 USPS *Two Hybrid Assay*

Das USPS *Two Hybrid*-System (*Ubiquitin Split Protein Sensor*) basiert auf der Fähigkeit getrennt exprimierter Ubiquitin-Domänen *in vivo* funktionales Ubiquitin zu rekonstituieren (Johnson *et al.*, 1994a, Johnsson *et al.*, 1994b). Ähnlich dem GAL4 *Two Hybrid*-System (4.4.1.1) bedient sich auch USPS der Hefe *S. cerevisiae*; im Gegensatz zum konventionellen *Screen* erlaubt USPS jedoch auch den Nachweis von Protein-Interaktionen ausserhalb des Zellkerns, während beim GAL4 *Two Hybrid* beide Fusionsproteine im Nucleus vorliegen müssen, um dort transkriptionsaktivierend wirken zu können. Damit stellt USPS ein nützliches Werkzeug zur Detektion von Interaktionen dar, bei denen ein oder beide Partner im Cytoplasma verbleiben (wie z. B. im Fall von Transmembran-Proteinen, Cytoskelett-assoziierten Proteinen oder solchen Proteinen, die grössere Multimere ausbilden). Indem ein zu untersuchendes *Bait*-Protein sowie eine cDNA-Bank mit dem C- bzw. N-terminalen Anteil von Ubiquitin (C_{ub} bzw. N_{ub}) fusioniert werden, können mögliche Interaktionen durch eine Ubiquitin-Reassemblierung nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgt mittels Ubiquitin-abhängiger Proteasen, die im Falle einer Wechselwirkung ein Reporter-Protein vom C-Terminus der *Bait*- C_{ub} -Fusion abspalten. Die Abtrennung des Reporter-Proteins resultiert in dessen Degradation und einer damit verbundenen Änderung des Hefe-Phänotyps (4.4.5). Ubiquitin-abhängige Proteasen sind in Cytoplasma und Nucleus aller eukaryotischen Zellen enthalten und erkennen nur rekonstituiertes Ubiquitin, nicht aber dessen separate Fragmente.

Die zur Durchführung eines USPS *Two Hybrid Screens* erforderlichen Komponenten wurden freundlicherweise von der AG Dr. Ralph Panstruga/MPIZ Köln zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um den Hefe-Stamm JD53, das *Bait*-Plasmid pMet C_{ub} R-URA3 sowie eine *A. thaliana* cDNA-Bibliothek auf Basis des *Prey*-Plasmids p N_{ub} . In den *Bait*-Vektor pMet C_{ub} R-URA3 wurde die für das Cnx1-Protein codierende cDNA *in frame* mit C_{ub} und R-URA3 einkloniert. Das Plasmid besitzt den Selektionsmarker His und die Expression der *Bait*-Fusion kann durch Zugabe von Methionin zum Medium reprimiert werden. Die Expression der p N_{ub} -cDNA-Bibliothek kann durch Gegenwart von 100 μ M $CuSO_4$ hochreguliert werden. Der p N_{ub} -Vektor trägt den Selektionsmarker Trp.

4.4.2 Lagerung und Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefekulturen können für maximal 8 Wochen bei 4°C auf YPD- oder SD-Selektions-Agarplatten gelagert werden. Für eine langfristige Lagerung wurden die Hefen in YPD/25 % Glycerol bei -80°C eingefroren. Zur Reaktivierung wurde etwas Zellmaterial auf einer entsprechenden steri-

len Agarplatte ausgebracht und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert, um anschliessend von einer Einzelkolonie die gewünschten Flüssigkulturen anzupflanzen.

4.4.3 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurden von einer Einzelkolonie 50 ml Übernacht-Vorkulturen in YPD-Medium oder SD-Selektionsmedium bei 30°C und 240 rpm angeschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde eine 300 ml-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 angeimpft und für weitere 3 Stunden bei 30°C und 240 rpm inkubiert (nach dieser Zeit sollte die OD₆₀₀ bei mindestens 0,5 liegen). Nun wurden die Zellen für 5 min bei 1000 x g und RT pelletiert und vorsichtig in 25 ml sterilem H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden erneut wie oben pelletiert und das Pellet in frisch angesetzter, steriler TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7,5) resuspendiert. Die Kompetenz der Zellen bleibt für ca. 3 h bei RT erhalten.

4.4.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von Hefezellen wurden 100 ng Plasmid-DNA und 100 µg ssHeringssperma-DNA in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefässe vorgelegt. Pro Ansatz wurden 100 µl kompetente Hefezellen und 600 µl frisch angesetzte PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40 % PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C und 200 rpm wurden 70 µl DMSO zugesetzt. Es folgte eine Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 15 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden in einer Mikrofuge für 10 s bei 14000 x g pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl sterilem 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen wurde der Transformationsansatz auf SD-Selektions-Agarplatten ausgebracht und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

4.4.4.1 USPS Library Transformation

Für den USPS *Two Hybrid Screen* wurde die Technik der sequentiellen Transformation angewendet, indem zunächst das *Bait*-Plasmid pMet Cnx1 C_{ub} R-URA3 entsprechend 4.4.3/4.4.4 in den Hefestamm JD53 eingebracht und auf SD-Medium His⁻Met⁻Ura⁻ ausplattiert wurde. Von diesem Ansatz wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 50 ml-Vorkultur für 23 h unter Schwenken bei 30°C inkubiert, bis die stationäre Phase erreicht war (OD₆₀₀ > 1,5). Von dieser

Vorkultur wurden dann 300 ml SD-Medium His⁻Met⁻Ura⁻ angeimpft und für 7 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,45 gemessen werden konnte. Anschliessend wurden die Zellen bei 1000 x g und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 50 ml sterilem H₂O resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen pelletiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml frisch präparierter, steriler TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) resuspendiert und die PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40 % PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) vorbereitet. Es wurden folgende Komponenten gemischt: 15 µg cDNA-Bankvektor pN_{ub}, 2 mg ssHeringssperma-DNA und 1,5 ml kompetente Zellen. Der ganze Ansatz wurde gründlich gevortext, dann wurden 6 ml der sterilen PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben und erneut unter vortexen gemischt. Der Ansatz wurde bei 30°C für 30 min mit 200 rpm inkubiert. Es wurden 700 µl DMSO hinzugefügt und der Ansatz unter vorsichtigem Schwenken in einem Wasserbad bei 42°C für 15 min einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und bei RT mit 1000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml 1x TE resuspendiert und auf 10 15 cm-Platten mit Minimalmedium His⁻Trp⁻Met⁻FOA⁺CuSO₄⁺ (4.4.5) ausgebracht.

4.4.5 5-FOA Assay

Das in der *Bait*-Fusion an Cnx1 gekoppelte R-URA3-Protein ist ein leicht modifiziertes Derivat des Enzyms Orithidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, welches an der Biosynthese der Pyrimidin-Base Uracil beteiligt ist. Im Gegensatz zum nativen Enzym (URA3) besitzt R-URA3 einen zusätzlichen Arginin-Aminosäurerest am N-Terminus. Solange die *Bait*-Fusion intakt ist, ist R-URA3 aktiv und ermöglicht der Hefe ein Wachstum auf Medium Ura⁻. Kommt es aber im Zuge von Protein-Interaktionen zu einer Abtrennung des Reporters (4.4.1.2), resultiert dieses in einer schnellen Degradation aufgrund des nun exponierten Arginins am freien N-Terminus (*N-end rule*, Varshavsky *et al.*, 1997). Dementsprechend verliert die Hefe die Fähigkeit zur Uracil-Biosynthese. Neben seiner natürlichen Rolle vermag R-URA3 jedoch noch eine zweite Reaktion zu katalysieren, die in der Umsetzung des Pro-Toxins 5-FOA besteht. R-URA3 degradiert 5-FOA zu 5-Fluoro-Uracil, das für Hefe-Zellen toxisch ist. Daher erlaubt die Zugabe von 5-FOA zum Medium die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen während eines USPS *Two Hybrid Screens*, da nur solche Hefe-Zellen 5-FOA-resistent werden, in denen es zu einer Interaktion von *Bait* und *Prey* kommt.

Zum 5-FOA Assay wurde folgendes Medium eingesetzt (Angaben für 1 l Minimalmedium His⁻ Trp⁻Met⁻FOA⁺CuSO₄⁺):

Yeast Nitrogen Base (g)	6,7	Leucin (mg)	380
Uracil (mg)	50	CuSO ₄ x 5 H ₂ O (mg)	250
Lysin (mg)	76	Agar (g)	15

Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 5,8 wurde das Medium autoklaviert, nach Abkühlen auf ca. 55°C wurden 100 ml sterile 20 % Glucose und 1 g 5-FOA/10 ml DMSO zugegeben und das Medium in 15 cm-Petrischalen gegossen. Hefe-Zellen wurden als 5-FOA-resistent betrachtet, wenn es innerhalb von 6 Tagen zur Ausbildung von Kolonien kam.

4.4.6 β -Galaktosidase Assay

Beim GAL4-basierten *Two Hybrid*-Ansatz wurden Protein-Interaktionen über den β -Galaktosidase Assay nachgewiesen. Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Hefekolonien wurden auf Nitrocellulose-Membranfilter (Pall Gelman Sciences) übertragen und ihre Zellwände durch kurzfristiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die derart behandelten Filter wurden auf ein mit frisch angesetztem Reaktionspuffer [50 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 5,5 g/l NaH₂PO₄ x H₂O, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, pH 7,0), 135 μ l β -Mercaptoethanol, 835 μ l X- β -Gal (2 % in DMSO)] getränktes Filterpapier aufgebracht und für bis zu 8 h bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde regelmässig auf Blaufärbung kontrolliert. Eine Blaufärbung innerhalb von 8 Stunden zeigte eine Interaktion der beiden Proteine an.

4.4.7 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Zur Plasmidisolierung wurden 3 ml YPD (oder entsprechendes Selektionsmedium) angeimpft und die Kultur für 1-3 Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen aus 1,5 ml Suspensionskultur wurden für 5 s in einer Tischzentrifuge pelletiert und nach dem Dekantieren des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lysispuffer, 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und ca. 0,3 g Säure-gewaschenen Glasperlen (Glass Beads 425-600 microns, Sigma) wurde der Ansatz für 2 min gevortext und anschliessend für 5 min bei 15000 x g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. 96 % Ethanol (-20°C) versetzt und die DNA für 30 min bei -20°C präzipitiert. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 15000 x g und 4°C wurde die DNA

pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, ein weiteres Mal auf gleiche Weise zentrifugiert, anschliessend getrocknet und für die Elektroporation in 20 µl H₂O aufgenommen.

4.4.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation werden durch eine angelegte hohe Spannung kurzfristig Poren in der Zellmembran erzeugt, durch welche DNA in die Zelle eindringen kann. Die Herstellung geeigneter kompetenter Zellen beruht auf der Entfernung der dabei störenden Salze. Dieses wurde durch Waschen mit dest. H₂O erreicht. Für die Transformation durch Elektroporation ist es empfehlenswert, die kompetenten Zellen immer frisch herzustellen. Der folgende Ansatz ergibt 10 Aliquots, die sofort verwendet oder nach Aufnehmen in 10 % Glycerol und Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert werden können.

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und 240 rpm inkubiert (ca. 3 h). Den Ansatz kühlt man für 30 min auf Eis ab, pelletiert die Zellen für 15 min bei 4000 x g und 4°C und dekantiert das LB-Medium möglichst vollständig ab. Es erfolgten mehrere Waschschrte mit eiskaltem sterilem dest. H₂O: 2 x 100 ml (1 Vol.), 1 x 50 ml (1/2 Vol.), 1 x 2 ml (1/50 Vol.). Das Pellet wurde jeweils möglichst vorsichtig auf Eis resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen wurden in 300 µl dest. H₂O (zum Einfrieren in 10 % Glycerol) aufgenommen und in 40 µl Aliquots aufgeteilt.

4.4.7.2 Elektroporation

Pro Ansatz wurde 1 ml steriles SOC-Medium in einem sterilen Reaktionsgefäß auf 37°C vorgewärmt. Die Küvetten für die Elektroporation wurden auf Eis vorgekühlt. Frisch hergestellte elektrokompente Zellen wurden auf Eis gehalten, eingefrorene Zellen auf Eis aufgetaut. Anschliessend wurden 1-4 µl der zu transformierenden, salzfreien DNA dazugegeben, durchmischt und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde jeder Ansatz kompetenter Zellen mit der DNA in eine Küvette überführt. Einstellungen an den Geräten:

PULSE CONTROLLER II (BioRad)	Widerstand	200 Ω
GENE PULSER II (BioRad)	Kapazität	25 µF
Set Volts	Spannung	2,5 kV

Die Felder >Actual Volts< und >Time Const< müssen gleichzeitig gedrückt werden. Der Widerstandswert sollte bei 200 Ω liegen. Zu hohe Salzkonzentrationen in der Lösung verringern diesen Wert, er darf jedoch auf keinen Fall unter 100 Ω liegen. >Set Volts< drücken \Rightarrow 2,5 kV (eingestellter Wert) erscheint im Display. Beide roten Knöpfe (Pulse) bis zum Pfeifton gemeinsam gedrückt halten. Sofort nach der Elektroporation wurden 400 μ l des vorgewärmten SOC-Mediums in die Küvette gegeben. Anschliessend wurde das gesamte Volumen der Küvette in das vorgewärmte Reaktionsgefäß mit SOC-Medium überführt und die Zellen für 1 h bei 37°C und 240 rpm zur Regeneration inkubiert. Die erhaltene Impulslänge (in msec) sollte notiert werden, da dieser Wert ein Maß für die Qualität der Transformation ist. Das Optimum liegt bei Werten zwischen 4,8 und 5,0. Bei zu geringen Werten war die Salzkonzentration zu hoch und kann durch eine geringere Menge an eingesetzter DNA reduziert werden. Je nach eingesetzter DNA-Menge und dem bei der Transformation erhaltenen Wert für die Impulslänge werden 100-400 μ l des Ansatzes auf LB-Antibiotikum-Platten ausgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei Mehrfachverwendung der Küvetten wurden diese mit Wasser und Ethanol gereinigt und zur Dekontamination im trockenen Zustand für 5-10 min mit UV-Licht bestrahlt.

4.4.8 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* mittels NucleoSpin Plasmid Kit

Die herkömmliche Methode der Plasmidisolierung aus Hefe, wie unter **4.4.7-4.4.7.2** beschrieben, ist relativ aufwändig, da diese aufgrund der Arbeiten mit Phenol/Chloroform besondere Vorsichtsmassnahmen erfordert sowie zur Retransformation in *E. coli* elektrokompente Zellen hergestellt werden müssen und die Elektroporation nicht immer erfolgreich verläuft. Aus den genannten Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, das den Einsatz des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey & Nagel) zur Plasmidisolierung aus Hefe erlaubt. Dabei besteht das Hauptproblem darin, die im Vergleich zu *E. coli* sehr widerstandsfähige Chitin-Zellwand der Hefen aufzubrechen, um den zellulären Inhalt einschliesslich der Plasmid-DNA freizusetzen. Dieses konnte erreicht werden, indem je Ansatz zunächst 4-5 ml einer 3-5 Tage alten Hefe-Kultur pelletiert und vom Überstand getrennt wurden. Nach Resuspendierung in 250 μ l A1-Puffer wurde eine Spatelspitze (ca. 50 μ l) Säure-gewaschene Glasperlen (Glass Beads 425-600 microns, Sigma) zugegeben und für 10 min gevortext, bevor der Überstand von den Glasperlen getrennt und für 15 Takte bei 80 % und Stufe 1,5 sonifiziert wurde (Branson Sonifier 250). Die nachfolgende Prozedur entspricht dem NucleoSpin Plasmid Kit-Protokoll. Auf diese Weise konnte eine nachhaltige Vereinfachung der Plasmidisolierung aus Hefe erzielt werden, zumal die so erhaltene DNA zur Retransformation in chemisch kompetente *E. coli*-

Zellen geeignet ist und daher die Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation entfallen können.

Im Zuge des durchgeführten USPS *Two Hybrid Screens* erfolgte zunächst eine Retransformation in *E. coli* DH5 α und Selektion auf LB-Amp-Agarplatten. Dieser Schritt diente aufgrund der besonders hohen chemischen Kompetenz des DH5 α -Stammes zur Anreicherung von *Bait*- und *Prey*-Plasmid, da beide Vektoren zunächst nur in geringen Mengen im DNA-Präparationsansatz aus Hefe vorlagen. Nach einer erneuten Plasmid-Minipräparation (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey & Nagel) wurde die amplifizierte Vektor-DNA in *E. coli* KC8 transformiert. Dieser Bakterienstamm besitzt Mutationen in Enzymen des Leucin-, Histidin- und Tryptophan-Biosyntheseweges und kann dazu verwendet werden, *Bait*- und *Prey*-Plasmid auf der Basis ihrer Hefe-Selektionsmarker voneinander zu trennen. Dabei wird die basale Expression des *Prey*-Plasmid-Selektionsmarkers (Trp) in *E. coli* genutzt, der es transformierten KC8-Zellen erlaubt, auf Trp⁻-Medium zu wachsen, während mit dem *Bait*-Plasmid transformierte Zellen (His) dies nicht vermögen. Als Selektivmedium wurde M9-Minimalmedium nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet, dem je Liter Endvolumen 15 g Agar und nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C 1 ml Ampicillin (50 mg/ml), 100 ml 10x DO-Medium Trp⁻ und 1 ml steril filtriertes 1 M Thiamin-HCl zugegeben wurden. Nach einer abschliessenden Plasmid-Minipräparation steht das *Prey*-Plasmid zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung.

Mittels der Technik der *Yeast Colony* PCR (4.2.2.3) kann eine Plasmidisolierung aus Hefe u. U. komplett umgangen werden, indem das entstehende PCR-Fragment des *Prey*-Vektors einer Restriktions- und DNA-Sequenzierungsanalyse unterzogen und zur weiteren Verwendung ggf. rekloniert wurde.

4.5 Arbeiten mit humanen Zelllinien

Zur möglichen Verifizierung von potentiellen Liganden des Cnx1-Proteins wurden Arbeiten mit humanen Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden die cDNA-Sequenzen des Cnx1-Proteins und möglicher Interaktionspartner sowohl in den pEGFP-C2- als auch den pDsRed-N1-Vektor (BD Biosciences) kloniert. Diese Plasmide exprimieren Fusionsproteine, die bei Anregung mit Licht einer adäquaten Wellenlänge grünes bzw. rotes Fluoreszenzlicht emittieren. Sie bedienen sich dafür des GFP-Proteins aus *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992) und eines rot fluoreszierenden Proteins aus *Discosoma sp.* (Matz *et al.*, 1999). Beide Proteine wurden durch Punktmutationen für die Expression in humanen Zellen optimiert. Das vom GFP- und DsRed-Anteil

emittierte Licht kann mit Hilfe eines geeigneten Filters am Mikroskop sichtbar gemacht werden. Kommen dabei grüne und rote Anteile zur Deckung (Co-Lokalisierung), ergibt sich ein Hinweis auf mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen. Aufgrund ihrer leichten Transfizierbarkeit wurden humane HeLa- und HEK293-Zellen für diese Versuche verwendet. Ihre Kultivierung erfolgte in „Dulbecco's Modified Eagles Medium“ (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) in Inkubatoren, die eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre (95 %) sowie einen CO₂-Partialdruck von 10 % und eine Temperatur von 37°C aufrechterhalten. Für Transfektionen wurden die Zellen auf mit Collagen beschichteten Deckgläschen ausgesät.

Die Arbeiten zur *in vivo*-Co-Lokalisierung wurden in den Laboren der AG Jockusch an der TU-Braunschweig durchgeführt. Zelllinien und sämtliche Medien wurden zur Verfügung gestellt.

4.5.1 Transiente Transfektion von HeLa- und HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion der HeLa- und HEK293-Zellen wurde mittels des „FuGENE 6 Transfection“-Reagenzes (Roche) durchgeführt. Pro *well* einer 12-*well*-Platte wurden 0,5 µg DNA mit 50 µl FCS-freiem DMEM-Medium vermischt. Es folgten die Zugabe von 1,5 µl FuGENE-Reagenz und eine 20 minütige Inkubation bei RT. Das Gemisch wurde auf die Zellen getropft. Bei Co-Transfektionen wurden von beiden Plasmiden jeweils 0,5 µg eingesetzt, das Volumen an FuGENE wurde auf 2 µl erhöht. In einigen Fällen, in denen die vierfache Menge an DNA im Ansatz vorlag, wurde die Transfektion mit 6 µl FuGENE durchgeführt. Zur Transfektion einer 10 cm-Kulturschale wurden 5 µg DNA, 500 µl FCS-freies Medium sowie 15 µl FuGENE verwendet.

4.5.2 Vorbereitung der transfizierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Kultur der transfizierten Zellen wurden diese fixiert, um die transient exprimierten Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Die Zellen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und dieses danach vollständig abgesaugt. Die Fixierung erfolgte durch Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit 0,2 % Triton-X-100 5 min lang bei RT permeabilisiert. Es folgte ein letzter Waschschriff mit PBS. Die Deckgläschen wurden mit Wasser gewaschen, leicht getrocknet und mit der Oberseite nach unten auf einen Tropfen Mowiol inklusive Bleichschutz gelegt. Das Aushärten der eingebetteten Präparate erfolgte bei 37°C ÜN.

4.5.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Präparate wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops Typ „LSM 5 Meta“ (Zeiss) ausgewertet. Einige Ausschnitte wurden unter Einsatz des „LSM 5 Image Browsers“ gescannt. Die Bildbearbeitung erfolgte ebenfalls über dieses Programm.

5. Zusammenfassung

Der Molybdäncofaktor ist essentieller Bestandteil aller eukaryotischen Molybdoenzyme. In *Arabidopsis thaliana* vermittelt das Cnx1-Protein die Molybdän-Übertragung auf Molybdopterin. Anhand der Homologie zum humanen Gephyrin, das zahlreiche Protein-Wechselwirkungen eingeht, wurde auf das Vorhandensein noch unbekannter Cnx1-Interaktionspartner geschlossen. Die vorliegende Arbeit war auf die Detektion von Proteinen fokussiert, die als Liganden an die pflanzliche Molybdän-Insertase binden.

Als konservierte Äquivalente von humanen Gephyrin-Interaktionspartnern kamen *A. thaliana* Profilin (PRF) und die GABARAP-homologen APG8-Proteine für eine Cnx1-Wechselwirkung in Pflanzen in Frage. Mit dem Ziel der Identifizierung solcher Interaktionen wurden verschiedene Versuchsansätze *in vitro* bzw. *in vivo* durchgeführt. Hinsichtlich einer möglichen Cnx1-Profilin-Bindung konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Indizien für eine Wechselwirkung (PRF1 mittels ELISA; PRF2 durch USPS *Two Hybrid*) liessen sich durch zusätzliche Experimente nicht erhärten. Im Falle der neun APG8-Proteine ergaben sich aufgrund biochemischer Ansätze für APG8g, h und i Hinweise auf eine Interaktion mit Cnx1, eine Bestätigung durch GAL4 *Two Hybrid* gelang jedoch nicht. In Form des ribosomalen L12-Proteins sowie der Untereinheiten der MPT-Synthase (Cnx6/7) wurden weitere Proteine als potentielle Cnx1-Interaktionspartner in Betracht gezogen, jedoch nach negativen Resultaten nicht eingehender untersucht.

Zur Suche nach neuen Interaktionspartnern wurde das USPS-System für eine Cnx1-*Bait*-Fusion etabliert. Das *Two Hybrid Screening* einer *A. thaliana* cDNA-Bank resultierte in der Identifizierung von fünf Proteinen, die potentiell mit der pflanzlichen Molybdän-Insertase in Wechselwirkung stehen. Dabei ergaben sich durch wiederholte Detektion im *Screen* und eine Kombination zur Verifizierung möglicher Interaktionen unternommener zellbiologischer und biochemischer Experimente Hinweise auf eine *in vivo*-Bindung an Cnx1. Mit der putativen Nukleotid-Hydrolase HIT konnte ein Protein bestimmt werden, für das eine Cnx1-Interaktion als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Mehrere Anhaltspunkte sprechen darüber hinaus für eine Cnx1-Wechselwirkung der Thioredoxine TRX H2/H3, des putativen Urease Hilfs-Proteins UreG sowie der Adenin Phosphoribosyltransferase APRT1. In Form des möglicherweise an Cnx1 bindenden putativen Kupfer-Chaperons CCH ergab sich eine potentielle Verbindung zur Umsetzung von Kupfer-Molybdopterin im dritten Schritt der Moco-Biosynthese und somit ein neuer Hinweis auf eine Vernetzung von Molybdän- und Kupfer-Stoffwechsel.

Durch die Identifizierung neuer putativer Cnx1-Interaktionspartner konnte die Grundlage für weiterführende Experimente zur endgültigen Verifizierung der Wechselwirkungen sowie zu deren funktioneller Charakterisierung geschaffen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Addiscott, T.M.**, Whitmore, A.P., Powlson, D.S. (1991): Farming, Fertilisers and the Nitrate Problem. *CAB International*, Oxford.
- Aguilar, M.**, Kalakoutsii, K., Cardenas, J., Fernandez, E. (1992): Direct transfer of molybdopterin cofactor to aponitrate reductase from a carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **307**(2):162-3.
- Alikulov, Z.A.** & Mendel, R.R. (1984): Molybdenum cofactor from tobacco cell cultures and milk xanthine oxidase: Involvement of sulfhydryl groups in dimerization activity of cofactor. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **179**, 693-705.
- Allen, M.**, Qin, W., Moreau, F., Moffatt, B. (2002): Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol. Plant.* **115**(1):56-68.
- Arst, H.N. Jr.**, MacDonald D.W., & Cove, D.J. (1970): Molybdate metabolism in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting nitrate reductase and/or xanthine dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **108**: 129-145.
- Bartels, H.** (1930): Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung. *Arch. Mikrobiol.* **1**: 333-342.
- Bittner, F.**, Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001): ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276** (44), 40381-40384.
- Boyington, J.C.**, Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe₄S₄ cluster. *Science* **275**, 1305-1308.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, C.** (2002): Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* **41**(29):9003-14.
- Brenner, C.**, Garrison, P., Gilmour, J., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G.A., Lowenstein, J.M. (1997): Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **4**(3):231-8.
- Broder, Y.C.**, Katz, S., Aronheim, A. (1998): The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr. Biol.* **8**(20):1121-4.
- Brown, G.M.** (1985). in Folate and Pterins (Blakley, R. L., and Benkovics, S. J., eds) Vol. **2**, pp. 299-419, John Wiley & Sons, New York

- Bruser, T., Selmer, T., Dahl, C.** (2000): "ADP sulfurylase" from *Thiobacillus denitrificans* is an adenylsulfate:phosphate adenyltransferase and belongs to a new family of nucleotidyltransferases. *J. Biol. Chem.* **275**(3):1691-8.
- Carlsson, L., Nystrom, L., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U.** (1976): Profilin, a low-molecular weight protein controlling actin polymerisability. In: Perry SV, *et al.*, ed Contractile systems in non muscle tissues Amsterdam, North Holland Publ **647**:39-49.
- Chan, M.K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M.W.W. & Rees, D.C.** (1995): Structure of a hyperthermophilic tungstopterin, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* **267**, 1463–1469.
- Christensen, H.E., Ramachandran, S., Tan, C.T., Surana, U., Dong, C.H., Chua, N.H.** (1996): Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J.* **10**(2):269-79.
- Cohen, H.J., Fridovich, I., Rajagopalan, K.V.** (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J. Biol. Chem.* **246**, 374-382.
- Contento, A.L., Xiong, Y., Bassham, D.C.** (2005): Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J.* **42**(4):598-608.
- Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., Gitlin, J.D.** (1997): The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**(38):23469-72.
- Davies, P.J.** (1995): The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: P.J. Davies (ed) Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer. Academic Publishers, Boston, MA, pp. 1-13.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., Vierstra, R.D.** (2002): The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **277**(36):33105-14.
- Dunn-Coleman, N.S.** (1984): Biochemical characterization of the molybdenum cofactor mutants of *Neurospora crassa*: *in vivo* and *in vitro* reconstitution of NADPH-nitrate reductase activity. *Curr. Genet.* **8**: 581-588.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. and Johnsson, N.** (1999): Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 329-344.
- Ehrhard, K.N., Jacoby, J.J., Fu, X.Y., Jahn, R., Dohlman, H.G.** (2000): Use of G-protein fusions to monitor integral membrane protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* **18**(10):1075-9. Erratum in: *Nat. Biotechnol.* 2000 Dec;**18**(12):1318.
- Eilers, T., Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R. and Mendel, R.R.** (2001): Identification and biochemical characterization of Arabidopsis thaliana sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276** (50), 46989-46994.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Luscher, B.** (1998): Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.* **1**(7):563-71.

- Estojak, J.**, Brent, R. & Golemis, E.A. (1995): Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Molecular and Cellular Biology* **15**:5820–5829.
- Falciani, F.**, Terao, M., Goldwurm, S., Ronchi, A., Gatti, A., Minoia, C., Li Clzi, M., Salmona, M., Cazzaniga, G. & Garratini, E. (1994): Molybdenum (VI) salts convert the xanthine oxidoreductase apoprotein into the active enzyme in mouse L929 fibroblastic cells. *Biochem. J.* **298**: 69-77.
- Fraser, E.D.**, Walsh, M.P. (1991): The major endogenous bovine brain protein kinase C inhibitor is a heat-labile protein. *FEBS Lett.* **294**(3):285-9.
- Frey P.A.** (1996): The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**(4):461-70.
- Fuhrmann, J.C.**, Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H. & Kneussel, M. (2002): Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J. Neurosci.* **22**, 5393-402.
- Gan, Z.R.** (1991): Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* **266**(3):1692-6.
- Gelhaye, E.**, Rouhier, N., Jacquot, J.P. (2004): The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**(4):265-71.
- Gerendas, J.**, Polacco, J.C., Freyermuth, S.K., Sattelmacher, B. (1999): Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **162**: 241–256.
- Giesemann, T.**, Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhorster, K., Rothkegel, M., Schluter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R.R., Kirsch, J., Jockusch, B.M. (2003): Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J. Neurosci* **23**, 8330-8339.
- Gill, G.C.** & Hippel, P.H. (1989): Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Glerum, D.M.**, Shtanko, A., Tzagoloff, A. (1996): SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**(34):20531-5.
- Goto, M.**, Sakurai, A., Ohta, K., & Yamakami, H. (1969): The structure of urothione. *J. Biochem.* **65**: 611-620.
- Gray T.A.**, & Nicholls, R.D. (2000): Diverse splicing mechanisms fuse the evolutionarily conserved bicistronic MOCS1A and MOCS1B open reading frames. *RNA* **6**(7):928-36.
- Gross-Hardt, S.**, & Reiss, J. (2002): The bicistronic MOCS1 gene has alternative start codons on two mutually exclusive exons. *Mol Genet Metab.* **76**(4):340-3.
- Grosskreutz, Y.**, Betz, H., & Kneussel, M. (2003): Rescue of molybdenum cofactor biosynthesis in gephyrin-deficient mice by a Cnx1 transgene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**(2):450-5.
- Guarente, L.** (1993): Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1639–1641.

- Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Guse, A.**, Stevenson, C.E., Kuper, J., Buchanan, G., Schwarz, G., Giordano, G., Magalon, A., Mendel, R.R., Lawson, D.M., Palmer, T. (2003): Biochemical and structural analysis of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MobA. *J. Biol. Chem.* **278**(28):25302-7.
- Gutsche-Perelroizen, I.**, Lepault, J., Ott, A., Carlier, M.F. (1999): Filament assembly from profilin-actin. *J. Biol. Chem.* **274**(10):6234-43.
- Gutzke, G.**, Fischer B., Mendel R.R., Schwarz G. (2001): Thiocarboxylation of molybdopterin synthases provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J. Biol. Chem.* **276**(39):36268-74.
- Hänzelmann, P.** & Meyer, O. (1998): Effect of molybdate and tungstate on the biosynthesis of CO dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Eur. J. Biochem.* **255**(3):755-65.
- Hänzelmann, P.**, Schwarz, G., Mendel, R.R. (2002): Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**(21):18303-12.
- Hänzelmann, P.**, & Schindelin, H. (2004): Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**(35):12870-5.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Hanaoka, H.**, Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y. (2002): Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* **129**(3):1181-93.
- Hanus, C.**, Vannier, C., & Triller, A. (2004): Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J. Neurosci.* **24**, 1119-28.
- Hasona, A.**, Ray, R.M. & Shanmugam, K.T. (1998): Physiological and genetic analyses leading to identification of a biochemical role for the moeA (molybdate metabolims) gene product in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**(6): 1466-72.
- Haugwitz, M.**, Noegel, A.A., Karakesisoglou, J., Schleicher, M. (1994): Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell* **79**(2):303-14.
- Hausinger, R.P.** (1997). Metallocenter assembly in nickel-containing enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**: 279–286.
- Hille, R.** (1996a): Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 397-404.
- Hille, R.** (1996b): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.
- Hille, R.** (2002): Molybdenum and tungsten in biology. *Trends. Biochem. Sci.* **27**(7):360-7.

- Himelblau, E.**, Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., Amasino, R.M. (1998): Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **117**(4):1227-34.
- Hinton, S.M.**, & Dean, D. (1990): Biogenesis of molybdenum cofactors. *CRC Rev. Microbiol.* **17**: 169-188.
- Hoff, T.**, Schnorr, K.M., Meyer, C., & Caboche, M. (1995): Isolation of two Arabidopsis cDNAs involved in early steps of Molybdenum co-factor biosynthesis by functional complementation of Escherichia coli mutants. *J. Biol. Chem.* **270**: 6100-6107.
- Honore, B.**, Madsen, P., Andersen, A.H., Leffers, H. (1993): Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett.* **330**:151-155.
- Huang, S.**, McDowell, J.M., Weise, M.J., Meagher, R.B. (1996): The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol.* **111**(1):115-26.
- Huang, Y.**, Garrison, P.N., Barnes, L.D. (1995): Cloning of the Schizosaccharomyces pombe gene encoding diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetrphosphate (Ap₄A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem. J.* **312** (Pt 3):925-32.
- Ichida, K.**, Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T. and Nishino, T. (2001): Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1194-1200.
- Ichimura, Y.**, Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000): A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**(6811):488-92.
- Johnson, J.L.**, Hainline, B.E. and Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J. Biol. Chem.* **255**, 1783-1786.
- Johnson, J.L.** & Rajagopalan, K.V. (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6856-6860.
- Johnson, J.L.**, Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V. and Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.* **259**, 5414-5422.
- Johnson, J.L.**, Bastian, N.R. and Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1390-1394.
- Johnson, M.E.**, & Rajagopalan, K.V. (1987a): *In vitro* system for molybdopterin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **169**: 110-116.
- Johnson, M.E.**, & Rajagopalan, K.V. (1987b): Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* Loci in *E. coli* molybdopterin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **169**: 117-125.
- Johnsson, N.** and Varshavsky, A. (1994a): Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10340-10344.

- Johnsson, N.** and Varshavsky, A. (1994b): Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO*, **13**, 2686-2698.
- Joshi, M.S.**, Johnson, J.L., & Rajagopalan, K.V. (1996): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* *mod* and *mog* mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 4310-4312.
- Ketelaar, T.**, Voss, C., Dimmock, S.A., Thumm, M., Hussey, P.J. (2004): Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett.* **567**(2-3):302-6.
- Kins, S.**, Betz, H. & Kirsch, J. (2000): Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *J. Nat. Neurosci.* **3**(1), 22-9.
- Kirisako, T.**, Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000): The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell. Biol.* **151**(2):263-76.
- Kirsch, J.**, Langosch, D., Prior, P., Littauer, U.Z., Schmitt, B., Betz, H. (1991): The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* **266**(33):22242-5.
- Kirsch, J.**, Wolters, I., Triller, A., & Betz, H. (1993): Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **366**(6457):745-8.
- Kisker, C.**, Schindelin, H. and Rees, D.C. (1997): Molybdenum cofactor containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.
- Kneussel, M.**, & Betz, H. (2000): Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci.* **23**(9), 429-35.
- Kneussel, M.**, Haverkamp, S., Fuhrmann, J.C., Wang, H., Wassle, H., Olsen, R.W., Betz, H. (2000): The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA_AR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**(15):8594-9.
- Kneussel, M.**, Brandstatter, J.H., Gasnier, B., Feng, G., Sanes, J.R., Betz, H. (2001): Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**(6):973-82.
- Koenig, F.** (2004): Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Gephyrin und dem Glycin-Rezeptor. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig.
- Kopitz, J.**, Kisen, G.O., Gordon, P.B., Bohley, P., Seglen, P.O. (1990): Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* **111**(3):941-53.
- Koshiba, T.**, Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789.
- Kramer, S.P.**, Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan, K.V. (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)-molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 16357-16363.

- Kuper, J.**, Llamas, A., Hecht, H.J., Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2004): Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 806–806.
- Laemmli, K.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lake, M.W.**, Temple, C.A., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H. (2000): The crystal structure of the *Escherichia coli* MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**(51):40211-7.
- Lake, M.W.**, Wuebbens M.M., Rajagopalan K.V., Schindelin H. (2001): Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* **414**(6861):325-9.
- Lambrechts, A.**, Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L.M., Robbens, J., Van Colen, I., Vandekerckhove, J., Fassler, R., Ampe, C. (2000): Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol. Cell. Biol.* **20**(21):8209-19.
- Laurent, T.C.**, Moore, E.C., Reichard, P. (1964): Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **239**, 3436-3444.
- Lee, D.**, & Moffatt, B.A. (1993): Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **87**:483-492.
- Leimkühler, S.**, Kern, M., Solomon, P.S., McEwan, A.G., Schwarz, G., Mendel, R.R., Klipp, W. (1998): Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol. Microbiol.* **27**(4):853-69.
- Leimkühler, S.**, Wuebbens, M.M., and Rajagopalan, K.V. (2001): Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of MPT synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **276**, 34695-34701.
- Leimkühler, S.**, Freuer, A., Santamaria Araujo, J.A., Rajagopalan, K.V., and Mendel, R.R. (2003): Mechanistic studies of human molybdopterin synthase reaction and characterization of mutants identified in group B patients of molybdenum cofactor deficiency. *J. Biol. Chem.* **278**, 26127-26134.
- Léon-Kloosterziel, K.M.**, Alvarez Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D and Koorneef, M. (1996): Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10** (4), 655-661.
- Levi, S.**, Logan, S.M., Tovar, K.R., Craig, A.M. (2004): Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **24**(1):207-17.
- Lima, C.D.**, Klein, M.G., Weinstein, I.B., Hendrickson, W.A. (1996): Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**(11):5357-62.

- Lin, S.J.**, Culotta, V.C. (1995): The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(9):3784-8.
- Lindecke, S.** (1999): Suche nach Cnx1-bindenden Proteinen in *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung des Hefe „two hybrid“-Systems. Diplomarbeit am Botanischen Institut der TU Braunschweig.
- Liu, M.T.W.**, Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. & Schindelin, H. (2000): Crystal structure of the gephyrin- related molybdenum cofactor biosynthetic protein MogA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275** (3): 1814-1822.
- Llamas, A.**, Mendel, R.R., Schwarz, G. (2004): Synthesis of adenylated Molybdopterin An essential step for molybdenum insertion *J. Biol. Chem.* **279**(53):55241-6.
- Llamas, A.**, Otte, T., Simons, A., Mendel, R.R., & Schwarz, G. (2005): The mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin: novel routes towards metal cofactor assembly. *Nat. Chem. Biol.*; Submitted.
- Ludden, P.W. et al.**, (1993): Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In Stiefel EI, Coucouvanis D, Newton WE (eds) Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems. ACS symposium series 535. *Amer. Chem. Soc., Washington DC*, pp 196-215.
- Magalon, A.**, Frixon, C., Pommier, J., Giordano, G., Blasco, F. (2002): In vivo interactions between gene products involved in the final stages of molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**(50):48199-204.
- Mahler, H.R.**, Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins.III. Aldehyde oxidase: A molybdoflavoprotein. *J.Biol. Chem.* **210**, 465-480.
- Mammoto, A.**, Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., Takai, Y. (1998): Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**(1):86-9.
- Massey, V.** & Edmondson, D. (1970): On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**, 6595-6598.
- Matthies, A.**, Rajagopalan, K.V., Mendel, R.R., & Leimkühler, S. (2004): Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**(16):5946-51.
- Matz, M.V.**, Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**(10):969-73. Erratum in: *Nat. Biotechnol* **17**(12):1227.
- Meier, J.**, De Chaldee, M., Triller, A. & Vannier, C. (2000): Functional heterogeneity of gephyrins. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 566-77.
- Menand, B.**, Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C. (2002): Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**(9):6422-7.

- Mendel, R.R.**, & Schwarz, G. (2002): Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). In "Molybdenum and tungsten: Their roles in biological processes", Metal ions in biological systems. Sigel, A. and Sigel, H. (eds); Dekker, M.; Inc., New York, Vol. **39**.
- Meyer, Y.**, Vignols, F., Reichheld, J.P. (2002): Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**:394-402.
- Mobley, H.L.T.**, Island, M.D., Hausinger, R.P. (1995): Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59**: 451–480.
- Moffatt, B.A.**, Pethe, C., Laloue, M. (1991): Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiol.* **95**: 900–908
- Mok, D.W.**, & Mok, M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**:89-118.
- Nagano, K.**, Nakamura, K., Urakami, K.I., Umeyama, K., Uchiyama, H., Koiwai, K., Hattori, S., Yamamoto, T., Matsuda, I., Endo, F. (1998): Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* **27**(3):799-807.
- Nason, A.**, Lee, K.-Y., Pan, S.-S., Ketchum, P.A., Lamberti, A. and De Vries, J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 3232-3246.
- Nicholas, D.J.D.** & Nason, A. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**, 353-361.
- Nieder, J.**, Stallmeyer, B., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor biosynthesis: Identification of *A. thaliana* cDNAs homologous to the *E. coli* sulfotransferase MoeB. In: Cram, W.J., De Kok, L.J., Stulen, I., Brunold, C. and Rennenberg, H. (eds). Sulphur metabolism in higher plants: Molecular, ecophysiological and nutritional aspects. *SPB Academic Publishers*, Amsterdam 275-277.
- Nieder, J.** (1999): Identifizierung und Charakterisierung des *E. coli* moeB-Homologon cnx5 in Pflanzen, funktionelle Analyse des eukaryontischen Genproduktes, sowie die Untersuchung der Einflüsse anderer Stoffwechselwege auf die Molybdäncofaktor-Biosynthese. Dissertation, TU-Braunschweig.
- Niederwieser A.**, Blau N., Wang M., Joller P., Atares M. & Cardesa-Garcia J. (1984): GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine, and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur J Pediatr.* **141**(4):208-14.
- Nowak, K.** (2004): Fluoreszierende Proteine als Vitalmarker in pflanzlichen Systemen am Beispiel der subzellulären Lokalisierung von Proteinen der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese, dem pflanzlichen Molybdoenzym Sulfitoxidase und von Sulfurtransferasen. Doktorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig.

- Pateman, J.A.**, Cove, D.J., Rever, B.M. and Roberts, D.B. (1964): A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.
- Pienkos, P.T.**, Shah, V.K. and Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5468-5471.
- Pitterle D.M.**, & Rajagopalan KV. (1989): Two proteins encoded at the *chlA* locus constitute the converting factor of *Escherichia coli chlA1*. *J. Bacteriol.*; **171**(6): 3373-8.
- Pitterle, D.M.**, & Rajagopalan, K.V. (1993): The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, pp. 13499-13505.
- Pitterle D.M.**, Johnson J.L., Rajagopalan K.V. (1993): *In vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. *J. Biol. Chem.* **262**, 13506-13509.
- Prasher, D.C.**, Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. **111**(2):229-33.
- Prior, P.**, Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J. (1992): Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* **8**, 1161-70.
- Pufahl, R.A.**, Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V.C., Penner-Hahn J.E., O'Halloran, T.V. (1997): Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**(5339):853-6.
- Rae, T.D.**, Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V. (1999): Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**(5415):805-8.
- Rajagopalan, K.V.**, & Johnson, J.L. (1992): The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**: 10199-10202.
- Ramming, M.**, Kins, S., Werner, N., Hermann, A., Betz, H., & Kirsch, J. (2000): Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10266-71.
- Rech, S.**, Deppenmeier, U., Gunsalus, R.P. (1995): Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *J. Bacteriol.* **177**(4):1023-9.
- Reiss, J.**, Cohen, N., Dorche, C., Mandel, H., Mendel, R.R., Stallmeyer, B., Zobot, M.T., Dierks, T. (1998): Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat. Genet.* **20**(1): 51-3.
- Remy, I.**, Michnick, S.W. (1999): Clonal selection and *in vivo* quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**(10):5394-9. Erratum in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999 Jun 22;**96**(13):7610.

- Romao, M.J.**, Archer, M., Moura, J.J.G., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R. (1995): Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido reductase from *D. gigans*. *Science* **270**, 1170-1176.
- Rossi, F.**, Charlton, C.A., Blau, H.M. (1997): Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**(16):8405-10.
- Rudolph, M.J.**, Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H.: (2001): Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nat. Struct. Biol.* **8**(1): 42-6.
- Sabatini, D.M.**, Barrow, R.K., Blackshaw, S., Burnett, P.E., Lai, M.M., Field, M.E., Bahr, B.A., Kirsch, J., Betz, H., Snyder, S.H. (1999): Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* **284**, 1161-4.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Santamaria-Araujo, J.A.**, Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R.R., Wray, V., Schwarz, G. (2004): The tetrahydropyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor. *J. Biol. Chem.* **279**(16):15994-9.
- Schindelin, H.**, Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**, 1615-1619.
- Schlüter, K.**, Jockusch, B.M., Rothkegel, M. (1997): Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **27**:97-109.
- Schomberg, S.**, & Stefan, D. (1997): Adenine Phosphoribosyltransferase. In: Schomberg, S., & Stefan, D. (eds) *Enzyme Handbook*, Vol. 13, Springer-Verlag Berlin, pp. 1-7.
- Schwartz, S.H.**, Léon-Kloosterziel, K.M., Koorneef, M. and Zeevaart, J.A.D. (1997): Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161-166.
- Schwarz, G.**, Boxer, D.H. & Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor biosynthesis. The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity. *J. Biol. Chem.* **272**: 26811-14.
- Schwarz, G.**, Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, H., Brinkmann, H. & Mendel, R.R. (2000): The molybdenum biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* **12**; 2455-2471.
- Schwarz, G.**, Schrader, N., Mendel, R.R., Hecht, H.H. & Schindelin, H. (2001): Crystal structure of human Gephyrin and plant Cnx1 G-domains: comparative analysis and functional implications. *J. Mol. Biol.* **312**(2):405-18.
- Seo, M.**, Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koorneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000): The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12908-12913.

- Shanmugan, K.T.**, V. Stewart, R.P. Gunsalus, D.H. Boxer, J.A.Cole, M. Chippaux, J.A. DeMoss, G. Giordano, E.C.C. Lin und K.V. Rajagopalan (1992): Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3425-3454
- Shaw, G.** (1994): Chemistry of adenine cytokinins. In: Mok D.W.S. and Mok M.C. (eds) Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Ann Arbor, MI, pp. 15-34.
- Shi, J.**, Bhattacharyya, M.K. (1996): A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Mol. Biol.* **32**(4):653-62.
- Sofia H.J.**, Chen G., Hetzler B.G., Reyes-Spindola J.F., Miller N.E. (2001): Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization *Nucleic Acids Res.* **29**(5):1097-106.
- Sola, M.**, Kneussel, M., Heck, I.S., Betz, H. & Weissenhorn, W. (2001): X- ray crystal structure of the trimeric N-terminal domain of gephyrin. *J. Biol. Chem.* **276**(27): 25294-301.
- Sola, M.**, Bavro, V.N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R.W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G.A., Schmitt, B., Betz, H., Weissenhorn, W. (2004): Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J.* **23**(13):2510-9.
- Sorger G.J.**, & Giles N.H. (1965): Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Genetics* **52**: 777-788.
- Soriano, A.** & Hausinger, R.P. (1999): GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**(20):11140-4.
- Spyrou, G.**, Enmark, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J. (1997): Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**(5):2936-41.
- Stallmeyer, B.**, Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., & Mendel, R.R. (1995): Molybdenum cofactor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two- domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J.* **8**: 751-762.
- Stallmeyer, B.**, Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L. & Mendel, R.R. (1999a): Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, pp. 698-705.
- Stallmeyer, B.**, Schwarz G., Schulze J., Nerlich A., Reiss J., Kirsch J. & Mendel R.R., (1999b): The neurotransmitter receptor anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants and mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96** (4): 1333- 8.
- Stewart, V.**, & MacGregor, C.H. (1982): Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE*, and *chlG* loci. *J. Bacteriol.* Aug; **151**(2): 788-99.
- Taylor, I.B.** (1991): Genetics of ABA synthesis. In Davies, W.J. and Jones, H.G. (eds). Abscissic acid, physiology and biochemistry. *Bios Publishers*. Oxford: 23-37.

- Valenta, R.**, Duchene, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1991): Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* **253**(5019):557-60.
- Varshavsky, A.** (1997): The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes.*, **2**, 13-28.
- Volk, M.**, Meyer, O., Frunzke, K. (1994): Metabolic relationship between the CO dehydrogenase molybdenum cofactor and the excretion of urothione by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Eur. J. Biochem.* **225**(3):1063-71.
- Wahl, R.C.** & Rajagopalan, K.V. (1982): Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (3), 1354-1359.
- Walker-Simmons, M.**, Kudrna, D.A. and Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.* **90**, 728-733.
- Wang, H.**, Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., Olsen, R.W. (1999): GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**(6714):69-72.
- Wang, C.W.**, Klionsky, D.J. (2003): The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.* **9**(3-4):65-76.
- Westerfeld, W.W.**, & Reichert, D.A. (1949): A new dietary factor related to xanthine oxidase. *Science* **109**: 68.
- Witte, C.P.**, Igeno, M.I., Mendel, R., Schwarz, G., Fernandez, E. (1998): The *Chlamydomonas reinhardtii* MoCo carrier protein is multimeric and stabilizes molybdopterin cofactor in a molybdate charged form. *FEBS Lett.* **431**(2):205-9.
- Witte, C.P.**, Isidore, E., Tiller, S.A., Davies, H.V., Taylor, M.A. (2001): Functional characterisation of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant. Mol. Biol.* **45**(2):169-79.
- Wittke, S.**, Lewke, N., Müller, S. and Johnsson, N. (1999): Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2519-2530.
- Wittke, S.**, Dünwald, M., Johnsson, N. (2000): Sec62p a component of the ER translocation machinery, contains multiple binding sites for sec-complex. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 3859-3871.
- Wuebbens, M.M.**, & Rajagopalan, K.V. (1995): Investigation of the early steps of molybdenum biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of in vivo labeling studies. *J. Biol. Chem.* **270**: 1082-1086.
- Wuebbens, M.M.**, & Rajagopalan, K.V. (2003): Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**(16):14523-32.
- Xiang, S.**, Nichols, J., Rajagopalan, K.V. & Schindelin, H. (2001): The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure (Camb.)* **9**(4): 299-310.

- Yamamoto, K.**, & Ishihama, A. (2005): Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* **56**(1):215-27.
- Yoshimoto, K.**, Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., Ohsumi, Y. (2004): Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**(11):2967-83.
- Zambelli, B.**, Stola, M., Musiani, F., De Vriendt, K., Samyn, B., Devreese, B., Van Beeumen, J., Turano, P., Dikiy, A., Bryant, D.A., Ciurli, S. (2005): UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn²⁺. *J. Biol. Chem.* **280**(6):4684-95.
- Zhang, C.**, Guinel, F.C., Moffatt, B.A. (2002): A comparative ultrastructural study of pollen development in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile mutant apt1-3. *Protoplasma* **219**(1-2):59-71.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf-R. Mendel danken, der als Leiter des Instituts für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig trotz vielfältiger Arbeitsbelastungen stets über den Stand meiner Promotion im Bilde war und dieser Arbeit aufgrund seines ausserordentlichen Erfahrungsschatzes richtungsweisende Impulse zu geben vermochte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Schwarz, der mich zu jeder Zeit unterstützt und gefördert hat. Sein Engagement und Vertrauen sowie die Fähigkeit, auch in schwierigen Momenten Optimismus zu verbreiten und neue Motivation zu verleihen, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus danke ich auch für das freundschaftliche Verhältnis jenseits von Labor und Arbeitsalltag.

Frau PD Dr. Susanne Illenberger danke ich für das Interesse an dieser Arbeit sowie die freundliche Bereitschaft zur Leitung der Promotionskommission.

Dr. Ralph Panstruga und Dr. Chiara Consonni vom MPIZ Köln danke ich für die Bereitstellung der Komponenten für den USPS *Two Hybrid Screen* sowie ihre Funktion als Anlaufstelle zur Diskussion verschiedenster Probleme, die sich bei der Arbeit mit dieser wenig etablierten Technik ergaben.

Bei meiner Diplomandin Birthe Smolinsky bedanke ich mich für die Durchführung der Arbeiten mit humanen Zellkulturen und bei Dr. Robert Hänsch für jederzeit guten Kontakt und die umfangreichen Hilfestellungen am LSM.

Besten Dank, Tanja Otte! Deine helfenden Hände haben regelmässig über Engpässe hinweggeholfen und mir gegen Ende dieser Arbeit erst ermöglicht, die Pipette an den Nagel zu hängen.

Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mendel sowie meinen Laborpraktikanten danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und das stets angenehme Arbeitsklima. Schliesslich soll ein Dank an meine Familie gehen, für die gesamte Unterstützung, Ablenkung und Aufheiterung, die mir in den vergangenen Jahren und insbesondere in den Wochen vor Abschluss der Arbeit zukam.

Sabrina, danke, dass es Dich gibt!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Jan Winking
Geburtsdatum:	26. Juni 1976
Geburtsort:	Lübeck
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Schul Ausbildung:

Aug. 1982-Juli 1986	Grundschule Gross Grönau
Aug. 1986-Juni 1988	Orientierungsstufe Thomas-Mann-Schule, Lübeck
Jul. 1988-Mai 1996	Gymnasium Thomas-Mann-Schule, Lübeck

Studium:

Okt. 1996-Dez. 1998	Grundstudium der Biologie an der TU Braunschweig, Vordiplom im Dezember 1998
Jan. 1999-Jan. 2002	Hauptstudium der Biologie an der TU Braunschweig
Mär. 2001-Jan. 2002	Diplomarbeit am Botanischen Institut der TU Braunschweig mit dem Thema: „Der letzte Schritt der Molybdäncofaktor-Biosynthese: Funktionelle Charakterisierung des aktiven Zentrums von Cnx1G aus <i>A. thaliana</i> “
Feb. 2002	Abschluss zum Diplom-Biologen

Berufliche Tätigkeit:

seit Feb. 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut (später Institut für Pflanzenbiologie) der TU Braunschweig und Promotion mit dem Thema: „Analysen zur Identifizierung von Interaktionspartnern der Molybdän-Insertase Cnx1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> “
----------------	---

Allgemeine Publikationen:

Schrader, N., Kim, E.Y., Winking, J., Paulukat, J., Schindelin, H., Schwarz, G. (2004): Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J. Biol. Chem.* **279**(18):18733-41.

Kuper, J., Winking, J., Hecht, H.J., Mendel, R.R., Schwarz, G. (2003): The active site of the molybdenum cofactor biosynthetic protein domain Cnx1G. *Arch. Biochem. Biophys.* **411**(1):36-46.